

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**Funcionalidad biológica de la resistencia a arsénico en la  
bacteria hipertolerante *Pseudomonas putida* KT2440**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias

**Antonio David Páez Espino**

DIRECTOR

Víctor de Lorenzo Prieto

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

Madrid, 2009



## ÍNDICE

<b>Índice de Figuras</b>	<b>6</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>10</b>
<b>Summary</b>	<b>13</b>
 <b>I. Introducción</b>	 <b>15</b>
1. Resistencia microbiana al arsénico ambiental	17
1.1. Introducción	17
1.2. Bioquímica y especiación de arsénico en el ambiente	19
1.3. Mecanismos de entrada de arsénico en bacterias	21
1.4. Oxidación de arsenito	22
1.5. Respiración anaerobia de arsenato a través de su reducción	22
1.6. Metilación de arsénico	23
1.7. Mecanismos microbianos de tolerancia a arsénico: el operón <i>ars</i>	24
1.7.1. Mecanismos de resistencia a arsénico en <i>P. putida</i> KT2440	26
2. Redundancia genética	28
2.1. <i>Ecoparalogía</i>	29
2.1.1. Origen evolutivo de la <i>ecoparalogía</i>	29
2.2. Transferencia horizontal de genes	30
2.2.1. Transferencia horizontal en <i>P. putida</i> KT2440	31
3. Fosfotricina (PPT) y Metionina sulfoximina (MetSox)	31
3.1. Fosfotricina (PPT)	31
3.1.1. Efectos de la PPT sobre diferentes grupos de microorganismos del suelo	32
3.1.2. Etapas en la degradación de la PPT. PPT- <i>N</i> acetiltransferasas. Descripción y anotación errónea	32
3.2. Metionina sulfoximina (MetSox)	34
 <b>II. Objetivos</b>	 <b>37</b>
 <b>III. Materiales y Métodos</b>	 <b>41</b>
1. Cepas bacterianas	43
2. Medios y condiciones de cultivo	44
3. Plásmidos	45
4. Transformación de las células	48
5. Transferencia de plásmidos por conjugación	48

6. Técnicas de manipulación de ADN	48
6.1. Aislamiento de ADN genómico y plasmídico	49
6.2. Diseño de oligonucleótidos	49
6.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	52
6.4. Secuenciación de ADN	52
6.5. Construcción de cepas mutantes de <i>P. putida</i> KT2440	52
6.5.1. Construcción de $\Delta ars1$ , $\Delta ars2$ , $\Delta phoN1$ y $\Delta phoN2$	53
6.5.2. Construcción de $\Delta R1$ , $\Delta R2$ , $\Delta H1$ y $\Delta H2$	55
6.5.3. Construcción de los dobles mutantes $\Delta ars1\Delta ars2$ , $\Delta phoN1\Delta phoN2$ , $\Delta R1\Delta R2$ y $\Delta H1\Delta H2$	56
6.5.4. Construcción de los plásmidos pVCI1, pVCI2, pVPPT1, pVPPT2, pVR1, pVR2, pVH1, pVH2	56
6.5.5. Construcción del plásmido pUCP-ArsN	57
7. Técnicas de manipulación de ARN	57
7.1. Extracción de ARN	57
7.2. Retrotranscripción seguida de reacción de PCR cuantitativa (RT-Q-PCR)	58
8. Técnicas de manipulación de proteínas	58
8.1. Obtención de los extractos proteicos para purificación de pMALR1 y pMALR2	58
8.2. Purificación de las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2	59
8.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida	59
8.4. Ensayos enzimáticos de ArsH's	60
8.4.1. Obtención de los extractos celulares	60
8.4.2. Ensayos de la actividad oxidoreductasa de las proteínas ArsH1 y ArsH2 de <i>P. putida</i> KT2440	60
8.5. Determinación <i>in vitro</i> de PPT y N-acetil-PPT	61
8.6. Ultracentrifugación analítica	61
9. Determinación de Arsénico total intracelular	62
10. Análisis de los datos de secuencia	62
<b>IV. Resultados</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo I. Caracterización de los operones <i>ars</i> de <i>P. putida</i> KT2440 y su funcionalidad. Procedencia del operón <i>ars1</i>. Ecomparalogía entre los operones <i>ars1</i> y <i>ars2</i></b>	<b>67</b>
1. Configuración de los operones <i>ars1</i> y <i>ars2</i> en <i>P. putida</i> KT2440	69
1.1. Las proteínas de expulsión de As(III) y Sb(III) en <i>P. putida</i> KT2440 pertenecen a la familia ArsB	69
1.2. Las arsenato reductasas de <i>P. putida</i> KT2440 (ArsC) dependen del acoplamiento con Tiorredoxina	71

2. La resistencia a As en <i>P. putida</i> KT2440 se inducen por As(III)	71
3. <i>P. putida</i> KT2440 es hiperresistente al arsénico	72
3.1. Fenotipo de los mutantes $\Delta ars1$ , $\Delta ars2$ y $\Delta ars1\Delta ars2$ : Resistencia y acumulación de arsénico. Solapamiento funcional de los operones <i>ars</i>	73
4. Los operones <i>ars1</i> y <i>ars2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 confieren resistencia en <i>E. coli</i>	75
5. <i>Ecoparalogía</i> entre <i>ars1</i> y <i>ars2</i> de <i>P. putida</i> KT2440	76
5.1. El operón <i>ars1</i> de <i>P. putida</i> KT2440 se adquirió debido a un evento de transferencia horizontal (TH)	76
5.2. <i>ars1</i> y <i>ars2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 son <i>ecoparálogos</i> . Misma función y distinta eficiencia a diferentes temperaturas	77
5.2.1. Diferencias en la transcripción a diferentes temperaturas	78
<b>Capítulo II. Genes accesorios al operón <i>ars</i> involucrados en la resistencia a As en <i>P. putida</i> KT2440</b>	<b>81</b>
1. Genes <i>arsH</i> de <i>P. putida</i> KT2440	83
1.1. Descripción de las proteínas ArsH de <i>P. putida</i> KT2440	83
1.2. Las proteínas ArsH1 y ArsH2 de <i>P. putida</i> KT2440 muestran actividad NADPH oxidorreductasa dependiente de FMN	84
1.3. Los genes <i>arsH</i> de <i>P. putida</i> KT2440 son funcionales. Fenotipos de las cepas mutantes frente a arsénico	86
1.4. Los genes <i>arsH</i> de <i>P. putida</i> KT2440 son funcionales en <i>E. coli</i> . Expresión heteróloga	87
2. Gen <i>arsN</i> de <i>P. putida</i> KT2440	87
2.1. Identificación y anotación del gen <i>arsN</i> (PP_1930.5) en el genoma de <i>P. putida</i> KT2440	87
2.2. El gen <i>arsN</i> de <i>P. putida</i> KT2440 es funcional frente a As(V)	89
<b>Capítulo III. Resistencia al herbicida Fosfotricina (PPT) en <i>P. putida</i> KT2440. Regulación subrogada a la presencia de arsénico</b>	<b>91</b>
1. El operón <i>ars1</i> de <i>P. putida</i> KT2440 está constituido por 3 genes más	93
2. Actividad Fosfotricina (PPT)- <i>N</i> -acetil transferasa en <i>P. putida</i> KT2440	94
2.1. <i>P. putida</i> KT2440 posee 2 genes anotados como PPT- <i>N</i> -acetil transferasas	94
2.2. <i>phoN1</i> (PP_1924) está vinculado al operón <i>ars1</i>	95
2.3. Análisis comparativo entre <i>phoN1</i> y <i>phoN2</i> de <i>P. putida</i> KT2440	96
2.3.1. Estructuras tridimensionales, secuencia de aminoácidos, % GC e índice de adaptación de codones (IAC)	96
2.3.2. <i>phoN1</i> y <i>phoN2</i> pertenecen a familias diferentes de proteínas	97
2.3.3. Solo <i>phoN1</i> está involucrado en la resistencia a <i>L</i> -PPT en <i>P. putida</i> KT2440	97

2.3.4. <i>phoN2</i> determina la resistencia de <i>P. putida</i> KT2440 a MetSox	99
2.3.5. PhoN1 de <i>P. putida</i> KT2440 transforma PPT en <i>N</i> -acetil PPT.	100
Ensayos enzimáticos	
2.3.6. El centro activo para MetSox no se conserva en <i>phoN1</i>	100
2.4. Los genes <i>phoN1</i> y <i>phoN2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 son funcionales en <i>E. coli</i>	102
 <b>Capítulo IV. Análisis de la regulación de la expresión de los operones <i>ars</i> de <i>P. putida</i> KT2440</b>	<b>103</b>
1. Estudio de los promotores putativos <i>Pars1</i> y <i>Pars2</i>	105
1.1. Secuencias	105
1.2. Especificidad de unión de ArsR1 y ArsR2 a las regiones operadoras	105
2. Proteínas reguladoras ArsR1 y ArsR2	107
2.1. Secuencias. Dominios conservados	107
2.2. Purificación de las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2	108
2.2.1. Conformación nativa de las proteínas reguladoras de los operones <i>ars</i> : ArsR1 y ArsR2. Ensayos de ultracentrifugación analítica	109
3. Reguladores transcripcionales ArsR de <i>P. putida</i> KT2440	111
3.1. Caracterización del fenotipo de los mutantes $\Delta R1$ , $\Delta R2$ y $\Delta R1\Delta R2$ . Resistencia frente a As y PPT	112
3.2. Caracterización del fenotipo de los mutantes $\Delta R1$ y $\Delta R2$ complementados. Resistencia frente a As y PPT	113
3.3. Complementación del doble mutante $\Delta R1\Delta R2$ con los vectores pVR1 y pVR2	114
 <b>V. Discusión</b>	<b>117</b>
1. Genes y mecanismos involucrados en la hiperresistencia a As en <i>P. putida</i> KT2440	119
2. Adquisición del operón <i>ars1</i> . <i>Ecoparalogía</i> entre <i>ars1</i> y <i>ars2</i> en <i>P. putida</i> KT2440	123
3. Regulación de la resistencia al herbicida PPT. Diferencias entre los mecanismos de tolerancia a PPT y MetSox en <i>P. putida</i> KT2440	125

<b>VI. Conclusiones</b>	<b>129</b>
<b>VII. Bibliografía</b>	<b>133</b>
<b>VIII. Anexo I</b>	<b>145</b>
1. Toxicidad de las diferentes especies de arsénico	147
2. Genes novedosos descritos como integrantes del operón <i>ars</i> en bacterias	147
3. Construcción de cepas mutantes de <i>P. putida</i> KT2440	148
4. Construcción de los plásmidos utilizados para complementaciones en <i>P. putida</i> KT2440	151
5. Recuperación de los fenotipos silvestres complementando mutantes $\Delta ars1$ y $\Delta ars2$ con pVCI1 y pVCI2	155
6. Genes contenidos en la isla de 62 kb donde se encuentra <i>ars1</i>	156
7. El estrés osmótico no es el factor que determina la <i>ecoparalogía</i> entre <i>ars1</i> y <i>ars2</i>	158
8. Uso de codones de <i>phoN1</i> vs <i>phoN2</i>	159

### Índice de Figuras

Figura 1	Diagrama de los diferentes procesos microbianos implicados en la bioquímica del arsénico ambiental	18
Figura 2	Arbol filogenético de bacterias que poseen los genes <i>ars</i>	27
Figura 3	Diferencias entre los distintos fenómenos de homología de secuencias de ADN	30
Figura 4	Etapas iniciales en la degradación de PPT por parte de microorganismos del suelo	34
Figura 5	Inhibidores de la GS	35
Figura 6	Esquema de la secuencia de construcción de los mutantes $\Delta ars1$ , $\Delta ars2$ , $\Delta phoN1$ y $\Delta phon2$	54
Figura 7	Esquema de las dos reacciones de PCR para amplificar las regiones <i>Up</i> y <i>Down</i> en los mutantes $\Delta R1$ , $\Delta R2$ , $\Delta H1$ y $\Delta H2$	56
Figura 8	Identidad de secuencias entre los 2 operones de resistencia a arsénico en <i>P. putida</i> KT2440	69
Figura 9	Filogenia de los distintos transportadores de As(III)/Sb(III) en bacterias	70
Figura 10	Alineamientos de ArsC de <i>P. putida</i> KT2440 con <i>B. subtilis</i>	71
Figura 11	Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 frente a As(III) a distintos tiempos	72
Figura 12	Ensayo en placa de resistencia frente a As(V) y As(III) en <i>P. putida</i> KT2440	73
Figura 13	Resistencia y acumulación de As en <i>P. putida</i> TEC1 y sus cepas derivadas, mutantes en los operones <i>ars</i>	74
Figura 14	Resistencia a As(V) y As(III) de la cepa <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ complementada con los operones <i>ars</i> de <i>P. putida</i> KT2440	75
Figura 15	Interrupción del gen <i>tmk</i> en <i>P. putida</i> KT2440	76
Figura 16	Variaciones de (A) % GC y (B) IAC entre el genoma de KT2440 y la isla genómica donde se encuentra el operón <i>ars1</i> de <i>P. putida</i> KT2440	77
Figura 17	Resistencia a arsénico a 15°C y 30°C de <i>P. putida</i> TEC1, $\Delta ars1$ y $\Delta ars2$	78
Figura 18	Expresión relativa de los operones <i>ars</i> de KT2440 a diferente Tª	79
Figura 19	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas ArsH de <i>P. putida</i> KT2440	83
Figura 20	Representación de la estructura tridimensional de los monómeros ArsH de <i>P. putida</i> KT2440	84
Figura 21	Ensayo de actividad oxidorreductasa en las cepas <i>P. putida</i> TEC1, $\Delta H1$ , $\Delta H2$ y $\Delta H1\Delta H2$	85
Figura 22	Ensayo de actividad NADPH:FMN oxidorreductasa relativa en <i>P.</i>	85



	<i>putida</i> TEC1, $\Delta$ H1, $\Delta$ H2 y $\Delta$ H1 $\Delta$ H2	
Figura 23	Crecimiento de las cepas TEC1, $\Delta$ H1, $\Delta$ H2 y $\Delta$ H1 $\Delta$ H2 a distintas concentraciones de As(V) y As(III)	86
Figura 24	Resistencia a arsénico de <i>E. coli</i> JM109 expresando los distintos genes <i>arsH</i> de <i>P. putida</i> KT2440	87
Figura 25	Localización del gen <i>arsN</i> de <i>P. putida</i> KT2440 y región promotora hipotética	88
Figura 26	Alineamiento de distintos homólogos de ArsN con ArgA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)	89
Figura 27	Resistencia frente a arsenato de <i>E. coli</i> con y sin el gen <i>arsN</i> de <i>P. putida</i> KT2440	90
Figura 28	Regiones intergénicas entre <i>arsH</i> , PP1926, PP1927 y PP1928 de <i>P. putida</i> KT2440	93
Figura 29	Distribución de los genes <i>phoN</i> en <i>P. putida</i> KT2440	94
Figura 30	Resistencia a PPT en <i>P. putida</i> TEC1, $\Delta$ <i>phoN1</i> , $\Delta$ <i>phoN2</i> y $\Delta$ <i>phoN1</i> $\Delta$ <i>phoN2</i> a distintas condiciones de +/- As(III)	95
Figura 31	Representación de la estructura tridimensional de los monómeros de PhoN1 y PhoN2 de <i>P. putida</i> KT2440	96
Figura 32	Alineamiento entre PhoN1 y PhoN2 de <i>P. putida</i> KT2440	97
Figura 33	Distancia filogenética entre las 2 familias de proteínas anotadas como PPT- <i>N</i> -acetiltransferasas	98
Figura 34	Resistencia a PPT de las cepas mutantes $\Delta$ <i>phoN1</i> y $\Delta$ <i>phoN2</i> complementadas	98
Figura 35	Resistencia a MetSox de las cepas mutantes $\Delta$ <i>phoN1</i> y $\Delta$ <i>phoN2</i> complementadas	99
Figura 36	Detección de PPT y <i>N</i> -acetyl PPT	100
Figura 37	Aminoácidos del centro activo de las proteínas que interactúan con MetSox	101
Figura 38	<i>Docking</i> molecular de PhoN2 con MetSox y PhoN1 con PPT	101
Figura 39	Resistencia a PPT y MetSox de <i>E. coli</i> , expresando <i>phoN1</i> y <i>phoN2</i> de <i>P. putida</i> KT2440	102
Figura 40	Putativos promotores <i>Pars1</i> y <i>Pars2</i>	105
Figura 41	Aproximación <i>in silico</i> de la unión de ArsR1 y ArsR2 a regiones intergénicas de <i>P. putida</i> KT2440	107
Figura 42	Símbolos conservados de ArsR1 y ArsR2 de <i>P. putida</i> KT2440	108
Figura 43	Principales etapas en la obtención de las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2	109
Figura 44	Velocidad de sedimentación. Distribución continua de concentraciones representada frente al coeficiente de sedimentación	111
Figura 45	Resistencia frente a arsénico y PPT de las distintas cepas de <i>P.</i>	113

	<i>putida</i> TEC1, $\Delta$ R1, $\Delta$ R2 y $\Delta$ R1 $\Delta$ R2	
Figura 46	Resistencia frente a arsénico y PPT de las distintas cepas $\Delta$ R1 (pVLT33), $\Delta$ R1 (pVR1), $\Delta$ R2 (pVLT33) y $\Delta$ R2 (pVR2)	114
Figura 47	Resistencia frente a arsénico y PPT de las distintas cepas $\Delta$ R1 $\Delta$ R2 (pVLT33), $\Delta$ R1 $\Delta$ R2 (pVR1) y $\Delta$ R1 $\Delta$ R2 (pVR2)	115
Figura 48	Número de genes de <i>P. putida</i> KT2440 con el mismo porcentaje de identidad respecto de la longitud	124

## ANEXO I

Figura 49	Organización genética de operones <i>ars</i> que contienen genes novedosos	148
Figura 50	Confirmación por PCR de la obtención de mutantes de delección de los operones <i>ars1</i> y <i>ars2</i>	149
Figura 51	Confirmación por PCR de la obtención de mutantes de delección en los genes <i>arsH1</i> y <i>arsH2</i>	150
Figura 52	Análisis por PCR de $\Delta$ R1, $\Delta$ R2 y $\Delta$ R1 $\Delta$ R2	151
Figura 53	Confirmación por PCR de la obtención de mutantes de delección de los genes <i>phoN1</i> y <i>phoN2</i>	151
Figura 54	Comprobación de la clonación de los operones <i>ars1</i> y <i>ars2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 en pVCl1 y pVCl2, respectivamente	152
Figura 55	Comprobación de la clonación de los operones <i>ars1</i> y <i>ars2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 en pGCl1 y pGCl2, respectivamente	153
Figura 56	Amplificación de los genes <i>arsH1</i> y <i>arsH2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 clonados en pVH1 y pVH2, respectivamente	153
Figura 57	Amplificación de los genes reguladores <i>arsR1</i> y <i>arsR2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 clonados en pVR1 y pVR2, respectivamente	154
Figura 58	Amplificación de los genes <i>phoN1</i> y <i>phoN2</i> de <i>P. putida</i> KT2440 clonados en pVPPT1 y pVPPT2, respectivamente	154
Figura 59	Amplificación de <i>arsN</i> a partir del vector pUCP-ArsN	155
Figura 60	Ensayo en placa de resistencia a As(V) y As(III) de los mutantes <i>ars</i> complementados	156
Figura 61	Resistencia a arsénico de TEC1, $\Delta$ <i>ars1</i> y $\Delta$ <i>ars2</i> en condiciones de estrés osmótico.	158
Figura 62	Uso de codones relativo de los genes <i>phoN</i> de <i>P. putida</i> KT2440	159

## Índice de Tablas

Tabla 1	Actividades enzimáticas que actúan sobre la PPT en diferentes organismos	33
Tabla 2	Cepas de <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Escherichia coli</i>	43
Tabla 3	Plásmidos	45
Tabla 4	Oligonucleótidos	49
Tabla 5	Oligonucleótidos utilizados y productos de PCR amplificados para obtener las distintas regiones <i>Up</i> y <i>Down</i>	54
Tabla 6	Oligonucleótidos utilizados y productos de la primera y segunda reacción de PCR	55
Tabla 7	Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los distintos plásmidos que complementan las deleciones indicadas	57
Tabla 8	Valores de resistencia a arsénico en los distintos mutantes de <i>P. putida</i> TEC1	75
Tabla 9	Operón <i>ars1</i> de <i>P. putida</i> KT2440	93
Tabla 10	Equilibrio de sedimentación de las proteínas de fusión	110

## ANEXO I

Tabla 11	Toxicidad de las especies de arsénico	147
Tabla 12	Genes contenidos en la isla de 62 kb donde se encuentra <i>ars1</i>	157

## ABREVIATURAS

<b>16S ADN<sub>r</sub></b>	Gen 16S ADN <sub>r</sub>
<b>A<sub>λ</sub></b>	Absorbancia medida en λ nm
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADN<sub>c</sub></b>	ADN complementario
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Ap<sup>r</sup></b>	Resistencia a ampicilina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARN<sub>m</sub></b>	ARN mensajero
<b>As(III)</b>	Arsenito
<b>As(V)</b>	Arsenato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina ( <i>Bovine seroalbumine</i> )
<b>cit</b>	Citrato
<b>Cm<sup>r</sup></b>	Resistencia a cloranfenicol
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, también llamado Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>Da</b>	Dalton
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gradiente en gel desnaturalizante
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y adenina
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
<b>FMN</b>	Mononucleótido de flavina
<b>FOA</b>	Ácido 5-Fluoroorótico

<b>Gm<sup>r</sup></b>	Resistencia a gentamicina
<b>gr</b>	Gramo
<b>GSH</b>	Glutación
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta definición
<b>HTH</b>	Hélice-giro-hélice ( <i>Helix-turn-helix</i> )
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	1000 pares de bases
<b>Km<sup>r</sup></b>	Resistencia a kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>MCS</b>	Sitio de clonación múltiple
<b>MetSox</b>	Metionina sulfoximina
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MM</b>	Medio mínimo
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>NAD</b>	Nicotina-adenina-dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotina-adenina-dinucleótido reducido
<b>NADPH</b>	Fosfato de Nicotina-adenina-dinucleótido reducido
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>Ohm</b>	Ohmio
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>Pm</b>	Peso molecular
<b>PPT</b>	Fosfinotricina

## ABREVIATURAS

<b>RBS</b>	Secuencia de union a ribosoma
<b>RT-PCR</b>	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
<b><math>\sigma</math></b>	Factor sigma de la ARN polimerasa
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>ura</b>	Uracilo
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido

## SUMMARY

The composition and gene distribution in bacterial genomes usually reflect the capacity of adaptation to different ecological niches. It is usual to find a direct link between a genome and the environment where it operates. But sometimes there are important enigmas difficult to explain, including the presence/absence of certain genes, genetic redundancies and regulatory associations with no apparent link. In this work we used *Pseudomonas putida* KT2440 to study some of these questions in a microorganism with some apparent genomic oddities in quest for a biological function. *P. putida* KT2440 is an ubiquitous saprophytic bacterium endowed with a remarkable adaptability to diverse environments. This bacterium which has been studied extensively as an experimental model for the biodegradation of aromatic compounds, bears two separate *ars* operons (encoding tolerance to arsenic) in the genome. The phenotypes determined by the duplicated *ars1* and *ars2* gene clusters of *P. putida* KT2440 (that endow the cell with hyperresistance to arsenic) were exploited to understand the selective pressure behind the paradoxical and apparently stable coexistence of virtually identical copies of the same gene set. We could demonstrate that the contribution of each *ars* operon to the phenotype of As tolerance was not additive, as either cluster sufficed to endow cells with a high-level of resistance to the metalloid. However, otherwise identical traits linked to each of the *ars* sites diverged when temperature was decreased. Growth of the various mutants at 15°C (instead of the standard 30°C for *P. putida*) uncovered that *ars2* afforded a much higher tolerance to As(V) and As(III) than the *ars1* counterpart. Moreover, the examination of the genomic context of each of the *ars* operons also revealed that the presence of arsenic in the medium has been evolutionary recruited as a signal for regulating expression of genes unrelated to the toxicity of the oxyanion. This includes a function as different as tolerance to the herbicide phosphinothricin (PPT). On this basis, the capacity of *P. putida* KT2440 to endure exposure to metals/lloids has to be understood from a wider evolutionary perspective, i.e. selection of its fine-tuning to face a toxic or *tinkering* with other regulatory networks.





## **I. INTRODUCCIÓN**

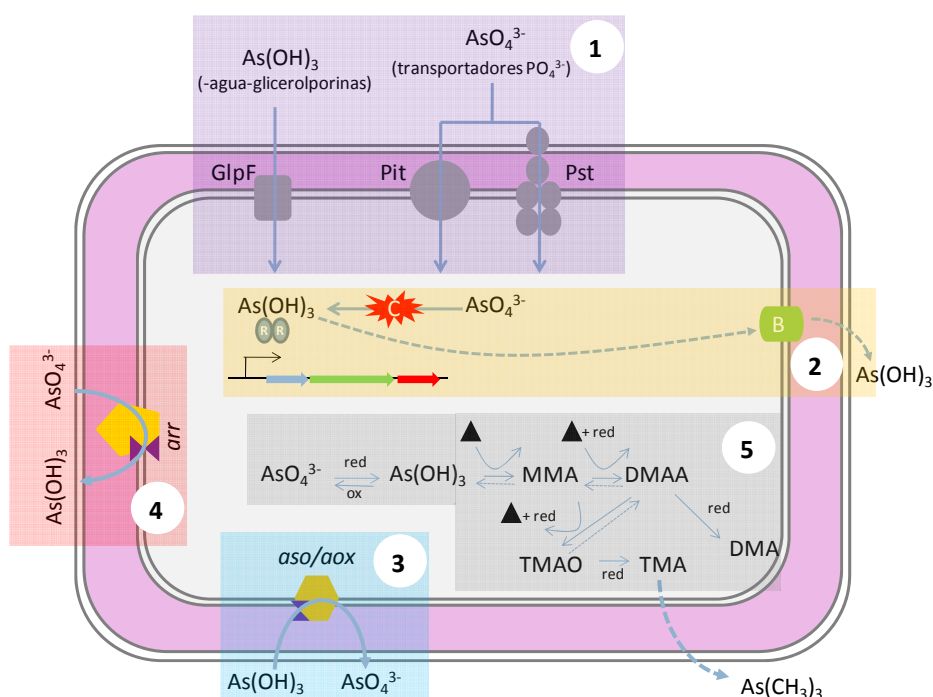


## 1. Resistencia microbiana al arsénico ambiental

### 1.1. Introducción

El arsénico ha sido una de las primeras sustancias químicas reconocidas como carcinógenas (Rosen, 1971). Sin embargo, nuestro conocimiento acerca de los mecanismos responsables de sus efectos oncogénicos sigue siendo incompleto en muchos casos (Pott *et al.*, 2001). De este modo, el MCL (Nivel Máximo de Contaminación) ha sido recientemente reducido de 50 µg/l (donde se tiene un riesgo de mortalidad por cáncer del 1 %) a 10 µg/l (Moore *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2007), lo que refleja cierta incertidumbre sobre esta cuestión. Aún con estos límites, se estima que más de 40 millones de personas en el mundo están en riesgo de beber agua contaminada por arsénico (Nordstrom, 2002) siendo, la difícil gestión de sus residuos, una de las principales razones de su toxicidad. (En la **Tabla 11** del ANEXO I se muestra la toxicidad de las principales especies de arsénico). El hecho de que este metaloide posea variedad en sus estados de valencia (+V, +III, 0, -III), dificulta el tratamiento y/o su eliminación. Además, el arsénico es muy abundante y se encuentra ampliamente distribuido por toda la corteza de la Tierra. Las principales fuentes de arsénico son naturales (asociadas a pizarras negras, zonas mineras, minerales, zonas volcánicas, aguas termales...) aunque también puede originarse como resultado de actividades humanas (minería, tratamiento de residuos, plaguicidas, actividad industrial; (Nordstrom, 2002). La mayoría de los usos del arsénico tanto en agricultura como en la industria se han suspendido a día de hoy aunque, los residuos de estas actuaciones han dejado una herencia de sitios altamente deteriorados (Leist *et al.*, 2000). Este hecho además se acentúa debido a que el arsénico se asocia a menudo con la pirita, uno de los minerales existentes más ubicuo, concentrándose en los depósitos que contienen sulfuros. Por otro lado, bajo condiciones anóxicas, el nitrato también es capaz de influir en el ciclo del As por oxidación del hierro ferroso, produciendo la adsorción del As a partículas de óxido férrico e incrementando así la forma más reactiva [As(V); Senn y Hemond, (2002)]. Sin embargo, dependiendo de las condiciones físico-químicas, el arsénico en estas partículas puede fácilmente disolverse en aguas subterráneas (Oremland y Stolz, 2005). Así, los estudios caso por caso son necesarios antes de seleccionar una estrategia de rehabilitación en un lugar contaminado.

Por todo ello, la gran mayoría de los organismos vivos no sólo han desarrollado mecanismos de resistencia al arsénico, sino que además algunos de ellos son capaces de utilizarlo, o incluso necesitarlo para la vida. La **Fig. 1** muestra un resumen de los procesos microbianos implicados en la bioquímica del arsénico ambiental. De este modo existen microorganismos que pueden utilizar As en la respiración (Macy *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1997a; Newman *et al.*, 1997b; Stolz y Oremland, 1999; Macy *et al.*, 2000; Silver y Phung, 2005) y/o como donadores de electrones (Macy *et al.*, 2000; Gihring y Banfield, 2001; Gihring *et al.*, 2001; Silver y Phung, 2005). Además de alterar el estado redox, algunos microbios pueden también metilar las especies inorgánicas del arsénico (Qin *et al.*, 2006) o bien, demetilar sus homólogos orgánicos (Ridley *et al.*, 1977; Silver y Misra, 1984; Silver y Phung, 2005; Notti *et al.*, 2007). Tales actividades microbianas tan frecuentes tanto en aguas como en sedimentos influyen fuertemente en la especiación y biodisponibilidad del metaloide (Oremland y Stolz, 2005), participando activamente en su ciclo biogeoquímico.



**Fig. 1. Diagrama de los diferentes procesos microbianos implicados en la bioquímica del arsénico ambiental.** (1) El arsénico entra en la célula a través de los canales de fosfato (arsenato) o de agua-glicerolporinas (arsenito). (2) Una vez en el interior de las células, el arsenato es reducido a arsenito a través de ArsC, para posteriormente ser expulsado a través de ArsB. (3) El arsenito puede servir como donador de electrones oxidándose a arsenato. (4) El arsenato puede utilizarse como aceptor final de electrones durante la respiración celular. (5) El arsénico inorgánico puede transformarse en especies orgánicas a partir de cascadas de metilación. Fig. Adaptada de (Paez-Espino *et al.*, 2009).

## 1.2. Bioquímica y especiación de arsénico en el ambiente

El arsénico puede encontrarse en la naturaleza en cuatro estados de oxidación, arsenato [As(V)], arsenito [As(III)], arsénico elemental [As(0)] y arseniuro [As(-III)]. Los dos estados de oxidación más altos son los más comunes en los ecosistemas, mientras que los dos más bajos son difíciles de encontrar (Rosen, 2002; Oremland y Stolz, 2003). Existen múltiples trabajos en los que se establece claramente una relación directa entre la actividad microbiana y la especiación de arsénico en el ambiente, por lo que dependiendo de las características físico-químicas del lugar y la estructura de la población microbiana, pueden predominar distintas especies del tóxico. Por ejemplo, en las aguas termales *Meager Creek* (BC, Canadá) las principales especies de arsénico encontradas en los tapetes microbianos son el arsenato y arsenito junto con pequeñas cantidades de arsenoazúcares (Koch *et al.*, 1999). En otros nichos como la rizosfera, la acumulación de arsénico en las plantas de los humedales origina la formación de oxihidróxidos de hierro, los cuales precipitan sobre la superficie de las raíces para formar unas estructuras peculiares llamadas *placas de hierro* (Otte *et al.*, 1995). En los manantiales geotérmicos presentes en el Parque Nacional de Yellowstone, en EE.UU, (pH 3.1, 58-62°C) donde a menudo existen concentraciones de arsenito de entre 10-40 µM, existe una rápida tasa de oxidación del anión, dando lugar a asociaciones ricas en Fe/As [encontrándose así contenidos en co-oxihidróxido de Fe(III) precipitado con As(V) en las comunidades microbianas (Langner *et al.*, 2001)]. Además, en estos lugares, los cambios en los sistemas biológicos parecen coincidir con la actividad arsenito oxidasa. En este sentido, la aparición de secuencias de 16S ADNr de arqueas pertenecientes a *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* simultáneamente con el inicio de la oxidación del As(III), indicó que estos microorganismos eran los responsables de dicha actividad. Estas comunidades microbianas se encontraban dominadas por microorganismos filogenéticamente relacionados con *Hydrogenobacter acidophilus* y *Desulphurella* sp. (Jackson *et al.*, 2001). En ambientes diferentes, utilizando la electroforesis de geles desnaturizantes en gradiente (DGGE), junto a la secuencia del 16S ADNr, se pudo constatar que la exposición a los residuos mineros estimulaba el número de poblaciones similares a especies de los géneros *Caulobacter*, *Sphingomonas*, y *Rhizobium*. Contrariamente a lo que ocurre en los manantiales geotérmicos explicados

anteriormente, estas comunidades tienen la capacidad de reducir rápidamente arsenato (Macur *et al.*, 2001). Las bacterias respiradoras de As(V) son capaces de liberar As(III) de sedimentos (Hemond, 1995) y minerales (Newman *et al.*, 1997a; Newman *et al.*, 1997b), o de óxidos de aluminio o ferrihidrita (Appelo *et al.*, 2002). Además, en un caso interesante, la cepa *Alcalilimnicola ehrlichei* MLHE-1 se describe como una bacteria capaz de reducir arsenato y nitrato acoplado a la oxidación de arsenito (Oremland *et al.*, 2002). Otros estudios experimentales también han arrojado algo de luz sobre diferentes actividades microbianas en el arsénico ambiental. Un caso interesante fue el análisis de mesocosmos suelo-agua-sedimento en los procesos de lixiviación y esorrentía de lugares contaminados con el metaloide. En este caso, el 7.5 % del arsénico total se mantuvo en el agua como As(V); el 44 % en la zona de los sedimentos superficiales también como arsenato junto con restos de ácido dimetil arsénico (DMAA) y el 48 % fue a la zona de sedimentos más profundos correspondiéndose principalmente con arsenito (Ruokolainen *et al.*, 2000). En un estudio separado, se encontraron cinco aislados de bacterias ambientales capaces de transformar el arsenato en arsenito y metilarsinas volátiles. Las cepas pertenecían a los géneros *Proteus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium* y *Pseudomonas* (Shariatpanahi *et al.*, 1981). Se puede por tanto documentar la amplia capacidad de actuación sobre el arsénico que poseen algunas bacterias, mostrando diferentes procesos bioquímicos con distintos resultados.

Por otro lado, el arsénico también puede aparecer naturalmente en sus formas orgánicas derivadas, lo que implica la presencia de uniones C-As. Algunos microorganismos son capaces de formar compuestos de As en sus formas mono-, di-, y/o tri-metiladas. Un ejemplo de ello es *Rhodopseudomonas palustris* (Qin *et al.*, 2006), una especie capaz de catalizar la formación de un número de intermediarios metilados a partir de As(III), teniendo a la tri-metilarsina (volátil) como producto final. Aunque estas especies de arsénico son más genotóxicas que otras (inorgánicas y orgánicas), se convierten rápidamente en sus correspondientes derivados oxidados, que son menos nocivos (**Tabla 11**). Además, los compuestos organo-arsénicos también puede ser demetilados (Notti *et al.*, 2007). Un ejemplo de ello es la utilización de arsonacetato o arsonocloroacetato como única fuente de carbono y energía para la

cepa ASV2, una bacteria Gram-negativa no identificada. La especie de arsénico final en este caso es probable que sea el arsenito ya que también se encontró actividad arsenito oxidasa en dicha cepa (Quinn y McMullan, 1995). Por último, también se han encontrado óxidos de trimetil arsina (TMAO) en sedimentos de algunas aguas costeras, a partir de la conversión de arsenobetainas (Kaise *et al.*, 1985).

### 1.3. Mecanismos de entrada de arsénico en bacterias

A pesar de su utilización por algunos microorganismos como aceptor o donador de electrones, el As no juega ningún papel metabólico o nutricional en el citoplasma bacteriano. De este modo, las células no requieren arsenato o arsenito intracelular (los dos estados de oxidación del arsénico más frecuentes en la naturaleza), y por lo tanto no han desarrollado ningún sistema dedicado exclusivamente para el acceso del mismo. En cambio, el arsénico entra en las células a través de diferentes transportadores debido a la analogía de sus especies químicas con otras moléculas (Rosen y Liu, 2008). En concreto, el arsenato es un oxianión químicamente muy parecido al fosfato (ampliamente distribuido y esencial para la vida). Por lo tanto, no es ninguna sorpresa que los sistemas Pit (transportador de fosfato) y PST (transportador específico de fosfato) descritos en *E. coli* (Harold y Baarda, 1966; Moran *et al.*, 1977; Rosen, 2002), también resulten ser los principales sistemas de entrada para el arsenato en esta bacteria (Willsky y Malamy, 1980), con una fuerte preferencia por el sistema Pit. Por otra parte, el arsenito a pH fisiológico está mucho más representado como una molécula sin carga  $\text{As}(\text{OH})_3$ , que como su forma oxianiónica (Ramirez-Solis *et al.*, 2004). En este caso, el As(III) es transportado al interior de las células a través de una rama de la superfamilia de transportadores aquaporinas (agua-glicerolporinas) como GlpF en *E. coli* (Meng *et al.*, 2004)]. También se han descrito homólogos de dicha proteína GlpF en otros organismos tales como *Leishmania major* (Gourbal *et al.*, 2004) o *Pseudomonas putida* (Paez-Espino *et al.*, 2009) siendo probable que sea la vía de transporte para el arsenito en la mayoría de las bacterias. Además, algunos mecanismos de entrada de azúcares son capaces del transporte de arsenito en levaduras (permeasas de hexosa; Liu *et al.*, 2004) y en células de mamíferos (permeasas de glucosa; Liu *et al.*, 2006). Estas observaciones dejan abierta la

posibilidad de que otros sistemas de transporte de solutos, no identificados hasta el momento, puedan ser operativos también para la entrada de arsenito en bacterias.

#### 1.4. Oxidación de arsenito

Algunas bacterias ambientales son capaces de utilizar el arsenito como donador de electrones en sus reacciones metabólicas. Por lo tanto, la oxidación biológica del As(III) constituye un mecanismo de detoxificación muy importante para gran cantidad de microorganismos (Tamaki y Frankenberger, 1992). Debido a la disponibilidad de algunas estructuras cristalizadas de arsenito oxidasas (*Alcaligenes faecalis*, *Rhizobium* sp. y *Hydrogenophaga* sp. strain NT-14), el mecanismo de actuación de estas proteínas comienza, en parte, a clarificarse (Ellis *et al.*, 2001; vanden Hoven y Santini, 2004). El enzima encargado de la transformación de As(III) a As(V) es un miembro de la familia de reductasas DMSO que presenta 2 subunidades; una grande (AoxB, 90 kDa aprox) que contiene un átomo de Mo unido a 2 cofactores de piranopterina y otra pequeña (AoxA, 14 kDa) con un sitio [2Fe-S] (Ellis *et al.*, 2001). En los operones que se conocen a día de hoy para las arsenito oxidasas, el orden *aoxAB* siempre se mantiene presente como en *Cenibacterium arsenoxidans* strain ULPAs1 (Muller *et al.*, 2003), aunque además pueden encontrarse otros genes como en *aoxRSABC* de *Agrobacterium tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006) y *Rhizobium* sp. NT-26 (vanden Hoven y Santini, 2004), donde *aoxR* codifica una proteína del tipo NtrC que actúa como regulador, *aoxC* es una isoforma del citocromo  $c_2$  y *aoxS* es un receptor periplasmático de arsenito que actúa como un sensor histidina kinasa.

#### 1.5. Respiración anaerobia de arsenato a través de su reducción

El hecho de haber podido aislar bacterias que respiran arsenato pertenecientes a grupos filogenéticos muy diferentes (Gram-positivos,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\epsilon$ -Proteobacterias y *Chrysiogenes arsenatis*) sugiere su amplia distribución por todo el dominio Bacteria (Macy *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1997a; Stolz y Oremland, 1999; Silver y Phung, 2005), siendo el donador de electrones utilizado muy variable de una especie a otra (Stolz y Oremland, 1999). La reacción de reducción de arsenato tiene lugar a través de una proteína de unión a membrana (Macy *et al.*, 2000) codificada por el operón *arr*,



que incluye en su configuración a los genes *arrA* y *arrB*. Se han purificado y caracterizado las arsenato reductasas de respiración (Arr) de *C. arsenatis* y *Bacillus selenitireducens* (Krafft y Macy, 1998; Afkar *et al.*, 2003) estando constituidas por un heterodímero citoplasmático formado por 2 subunidades (ArrA, 87 kDa y ArrB, 29 kDa). La subunidad mayor es una molibdopterina con un núcleo de hierro-azufre [4Fe-4S] y la pequeña contiene [Fe-S] en el centro de la proteína, pareciendo ser una proteína relacionada con DmsB (DMSO reductasa) y la nitrito reductasa NrfC (Krafft y Macy, 1998). El enzima es muy específico de sustrato y no utiliza nitrato, sulfato, selenato o fumarato en la reacción. Por último, varios análisis genómicos han revelado una clara diversidad de genes en las proximidades del operón *arr*, incluso algunas cepas como por ejemplo *D. hafniense*, *A. metalliredigens* o *W. succinogenes* poseen una tercera subunidad en la proteína de membrana (ArrC).

### 1.6. Metilación de arsénico

La metilación del arsénico es un fenómeno ampliamente distribuido en la Naturaleza. Desde bacterias hasta humanos, la gran mayoría de organismos son capaces de realizar esta reacción, aunque, si bien es un proceso bien documentado en hongos y eucariotas, es bastante desconocido aún en bacterias. Así, las rutas de metilación propuestas para procariotas son las mismas que aquellas que fueron descritas para el hongo *Scopulariopsis brevicaulis* (Challenger, 1951). Estos mecanismos implican un conjunto de etapas en las cuales, a la reducción de las formas pentavalentes de As le sigue la adición oxidativa de un grupo metilo (Dombrowski *et al.*, 2005). Esto genera una cadena de productos metilados de especies químicas de arsénico: metil arsenito (MMA), dimetil arsenato (DMA-V), dimetil arsenito (DMA-III) y óxido trimetil arsina (TMAO). Encontramos ejemplos de metilación de arsénico tanto en bacterias aerobias como anaerobias (Bentley y Chasteen, 2002), incluyendo *Clostridium collagenovorans*, *Desulfovivrio gigas* [capaz de producir cantidades medibles de TMA (Michalke *et al.*, 2000)] y *Methanobacterium formicium* (productor de arsina). Más recientemente a partir del estudio en *Rhodopseudomonas palustris* (Qin *et al.*, 2006), se ha identificado el gen *arsM*, capaz de realizar todas las etapas en la metilación del arsénico, en más de 120 especies de bacterias y en diferentes arqueas.

### 1.7. Mecanismos microbianos de tolerancia a arsénico: el operón *ars*

Los operones *ars*, que codifican la resistencia/tolerancia a arsénico en bacterias, han sido estudiados en numerosos trabajos (Wu y Rosen, 1993; Rosen, 1995; Oremland y Stolz, 2003). Así, los genes *ars* se encuentran muy extendidos en la naturaleza y aparecen constantemente co-transcritos en una gran variedad de configuraciones genéticas, dependiendo de cada cepa específica (**Fig. 2**). El núcleo de genes del sistema incluye un represor transcripcional (ArsR), una bomba de expulsión de arsenito citoplasmático (ArsB) y una arsenato reductasa (ArsC) encargada de convertir arsenato en arsenito para su posterior expulsión (Xu *et al.*, 1998). Se han encontrado genes *ars* en un gran número de bacterias Gram-negativas pertenecientes a  $\alpha$  y  $\gamma$ -Proteobacterias así como en Firmicutes Gram-positivos, siendo su localización muy variada, tanto en regiones cromosómicas como codificados en plásmidos. El conjunto mínimo de genes dispuestos en un operón *arsRBC* se describió primero en el cromosoma de *E. coli* (Carlin *et al.*, 1995; Diorio *et al.*, 1995) y *P. fluorescens* MSP3 (Prithivirajasingh *et al.*, 2001b, a), así como en los plásmidos pI258 y pSX267 pertenecientes al género *Staphylococcus* (Silver, 1998). Una versión ampliada de los principales genes se puede encontrar en algunos plásmidos de *E. coli* como el R773 y el R46; (Silver, 1998) así como en el pKW301 de *Acidophulus multivivum* AIU301 (Suzuki *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1998). Estos operones ampliados consisten en la agrupación de los genes *arsRDABC*. ArsA es una ATPasa que proporciona energía a ArsB para la expulsión tanto de arsenito como antimonito, mientras que ArsD se identifica como una chaperona de arsénico que ayuda a la bomba ArsAB, transfiriendo los metaloides trivalentes As(III) y Sb(III) a la subunidad ArsA del transportador (Lin *et al.*, 2007) e incrementando así su afinidad. ArsD constituye un homodímero con tres pares de cisteínas relevantes en cada monómero. Otras cepas presentan diferentes reordenaciones con respecto al núcleo principal de genes *ars* (**Fig. 2**). En el caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una bacteria acidófila, quimiolitotrófica presente en ambientes de la minería, los genes *ars* están dispuestos en dos operones transcritos de manera divergente, *arsRC* y *arsBH*. Cuando se expresó el gen *arsH* de *T. ferrooxidans* en *E. coli*, no se observó ninguna mejora en la resistencia a arsénico del microorganismo (Butcher *et al.*, 2000). Sin embargo, el gen *arsH* del transposón Tn2502 del plásmido de

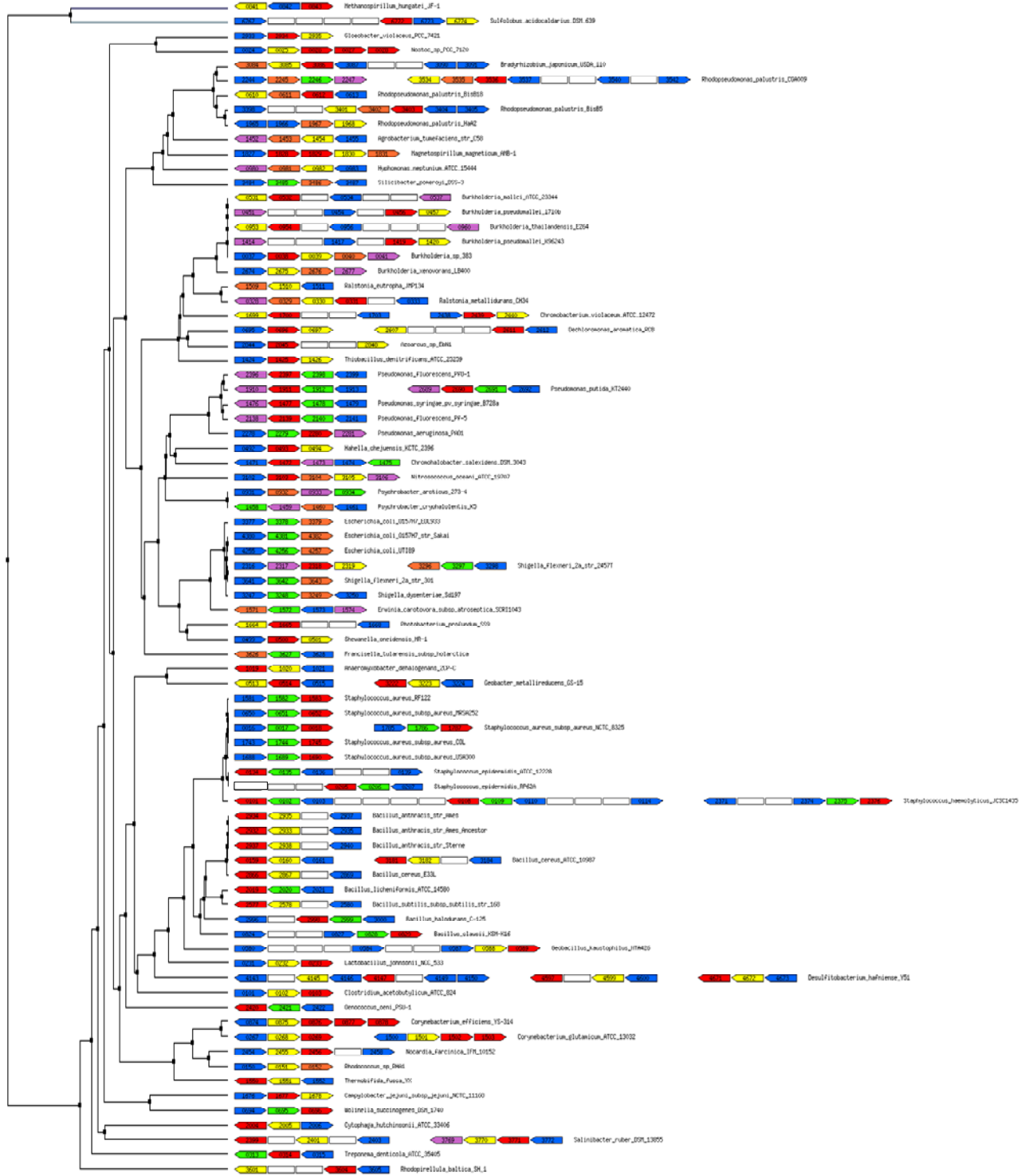
virulencia pYV en *Yersinia*, sí era necesario para conferir plena tolerancia al metaloide. En este transposón, la transcripción del gen *arsH* era divergente a la de los genes *arsBC*. Por tanto, a día de hoy aún no se ha establecido una relación directa entre los genes *arsH* y la resistencia al arsénico, aunque la reciente cristalización de las proteínas ArsH de *Shigella flexneri* y *Sinorhizobium meliloti* puede ayudar a resolver el enigma (Vorontsov *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007). Ambas proteínas han mostrado su capacidad de reducir NADPH (dependiente de FMN) y catalizar la reducción de colorantes azoicos. En el caso de los operones de *Pseudomonas*, se muestran en una organización diferente de la que se encuentra tanto en *A. ferrooxidans* como en el plásmido pYV de *Yersinia*. En este último caso, están constituidos por *arsRBCH*, con cierta similitud con los de *E. coli*, ya que todos los genes son co-transcritos en la misma orientación (Canovas *et al.*, 2003). Curiosamente, como se muestra en la **Fig. 2**, el gen *arsH* está presente en casi todas las bacterias Gram-negativas que contienen el operón *ars* pero no hay pruebas de su presencia en Gram-positivos. La transcripción del operón *ars* en *E. coli* se activa por arsenito (Cai *et al.*, 1998).

En procariotas se pueden encontrar dos familias diferentes de bombas de expulsión de As(III), la proteína propiamente llamada ArsB y también el gen de la familia de transportadores de arsenito ACR3. Respecto a su distribución, existe una clara prevalencia de los genes *arsB* en Firmicutes y  $\gamma$ -Proteobacteria, mientras que ACR3 se encuentra mayoritariamente representado en Actinobacteria y  $\alpha$ -Proteobacteria (Achour *et al.*, 2007) como se observa en la **Fig. 2**. Algo similar ocurre con las proteínas citoplasmáticas arsenato reductasas, para las que también existen dos familias diferentes en sus estructuras y mecanismos de reducción, basados en la ubicación de sus residuos de cisteína catalíticos. Por un lado, están las arsenato reductasas acopladas a tiorredoxina. En este grupo se incluyen las proteínas ArsC del plásmido pI258 de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, entre otros. El segundo tipo de reductasas utilizan glutaredoxina en la reacción bioquímica. Dentro de este grupo, encontramos a la proteína ArsC del plásmido R773 de *E. coli* y las reductasas ACR2p de eucariotas presentes en *Saccharomyces cerevisiae* (**Fig. 2**). Independientemente de su tipo y origen, todas las arsenato reductasas son enzimas citoplasmáticos de pequeño tamaño que convierten arsenato en arsenito por la participación secuencial de tres

diferentes grupos nucleófilos tiolados que funcionan como una cascada redox (Messens y Silver, 2006).

En la actualidad están siendo descritos otros genes novedosos en diferentes organismos como integrantes del operón *ars*. Tales son los casos de *arsO*, *arsT* y *arsN*. Tanto *arsO* como *arsT* se han encontrado presentes en el plásmido pHZ227 de *Streptomyces* sp. FR-008. Ambos genes codifican una monooxigenasa putativa de unión a flavina y una tiorredoxina reductasa putativa, respectivamente (Wang *et al.*, 2006). Esto puede determinar la implicación de *arsT* en la resistencia a arsenato, seguramente por su implicación en la reducción del mismo para su expulsión como arsenito. El gen *arsN* (perteneciente a la familia de las glutamato *N*-acetiltransferasas) fue primeramente aislado a partir de fangos de una planta de tratamiento de agua en una industria de pesticidas de la India, utilizando una librería metagenómica (Chauhan *et al.*, 2009). Se observó una clara implicación de *arsN* en la resistencia a arsenato cuando se sobreexpresaba de manera heteróloga en *E. coli*. Sin embargo, y a pesar de la distribución en diferentes organismos de estos genes con funciones novedosas, todos están limitados a la presencia del núcleo central del operón (*arsRBC*) para su funcionamiento (ver ejemplos de presencia de estos genes en ANEXO I).

**1.7.1. Mecanismos de resistencia a arsénico en *P. putida* KT2440.** *P. putida* KT2440, una bacteria ubicua del suelo, no patógena y de fácil manejo en el laboratorio, presenta dos copias del operón *ars* (compuestas por *arsRBCH*) localizadas en diferentes emplazamientos cromosómicos como único mecanismo aparente de resistencia a arsénico *in silico* (Canovas *et al.*, 2003). En el único trabajo existente en esta cepa no pudo determinarse la procedencia y funcionalidad de ambos segmentos cromosómicos. Si bien son altamente similares (posible duplicación genética para aumento de la eficiencia), uno de ellos se emplaza en una región atípica del genoma, pudiendo sugerir un evento de transferencia horizontal (Canovas *et al.*, 2003).



**Fig. 2. Arbol filogenético de bacterias que poseen los genes *ars*.** El árbol filogenético fue construido con las secuencias del gen 16S ADNr utilizando alineamientos Clustalw. Los diagramas muestran la organización de los operones *ars* para cada especie indicada. Código de colores: *arsR* en azul, *arsB* en verde, ACR3 en amarillo, *arsC* (acopladas a glutarredoxina) en naranja, *arsC* (acopladas a tiorredoxina) en rojo y *arsH* en morado. Otros genes encontrados en los operones o adyacentes a ellos se muestran como cuadros vacíos (Paez-Espino *et al.*, 2009).

## 2. Redundancia genética

La redundancia genética se considera un fenómeno que otorga un cierto grado de robustez a los organismos ya que, de este modo puede mantenerse estable un fenotipo ante mutaciones o bien alteraciones ambientales (Ihmels *et al.*, 2007). En procariotas, la mayor contribución al origen de los genes de una especie proviene de la evolución de secuencias parálogas, por duplicación y posterior divergencia de las mismas (Gogarten y Olendzenski, 1999) llegando incluso ciertas familias de genes redundantes a representar hasta el 50 % de un genoma bacteriano (Pushker *et al.*, 2004). En términos funcionales, la existencia de redundancia genómica se podría explicar en base a tres procesos selectivos: **(i)** La necesidad de una elevada dosis de proteína (daría lugar a una copia idéntica de los genes por duplicación), **(ii)** la diversificación de la proteína (dando lugar a genes divergentes parálogos; Raes y Van de Peer, 2003) y **(iii)** la adaptación a variaciones ambientales (dando lugar a genes con divergencia intermedia denominados *ecoparálogos*; Sanchez-Perez *et al.*, 2008).

La duplicación genética se suele producir en una especie en una primera instancia cuando existe una presión selectiva que requiere el incremento de la dosis proteica. En esos casos, por ejemplo cuando se trata de ciertos factores de elongación (Filer y Furano, 1981), se evita así la divergencia de los genes a través de eventos de recombinación entre copias con identidad muy alta. Sin embargo, cuando se requiere divergencia y desarrollo de funciones especiales diferentes entre genes duplicados (los llamados genes parálogos), el porcentaje de similitud entre las secuencias suele estar comprendido entre 30-45 % (Mira *et al.*, 2006). Éste es el caso de muchos transportadores de membrana, donde los diferentes genes parálogos se han especializado en el transporte de diferentes péptidos, azúcares o minerales (Sanchez-Perez *et al.*, 2008). Por último existe un tercer evento evolutivo donde existe un grado de divergencia intermedio que comprende a los llamados genes *ecoparálogos* los cuales, realizan la misma función celular bajo diferentes condiciones ambientales (Sanchez-Perez *et al.*, 2008). Existen claros ejemplos de bacterias que contienen genes potencialmente *ecoparálogos* a través de estudios *in silico* en *Salinibacter ruber*, *Haloarcula marismortui*, *Chromohalobacter salexigens* y *Fusobacterium nucleatum* (Sanchez-Perez *et al.*, 2008). Además, de manera experimental se han documentado

otros organismos con genes supuestamente *ecoparálogos* como son los casos de 2 versiones de la chaperona Hsp60 en *Haloferax volcanii*, que trabajan de manera eficiente a diferentes condiciones de salinidad (Kapatai *et al.*, 2006), o las tres oxidasas de cobre de *Myxococcus xanthus*, que muestran diferente actividad a diferentes concentraciones del metal (Sanchez-Sutil *et al.*, 2007).

## 2.1. *Ecoparalogía*

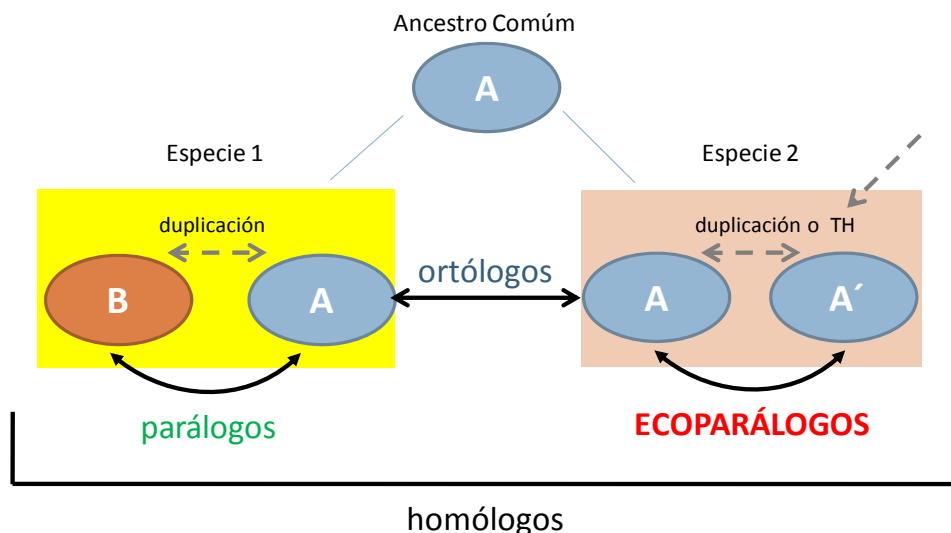
La *ecoparalogía* es un fenómeno que involucra a aquellos genes capaces de desempeñar un mismo cometido ante condiciones ambientales diversas, aumentando así el rango funcional de éstos. Los potenciales genes *ecoparálogos* de un genoma pueden detectarse por la presencia de más de un gen con la misma función, en un determinado microorganismo. Para confirmarlo, además, deben realizarse otro conjunto de análisis (Sanchez-Perez *et al.*, 2008). Entre ellos **(i)** se debe detectar la misma función de la/s proteína/s experimentalmente, o bien, la secuencia de interés debe mostrar identidad sólo con proteínas con función idéntica, cuando se enfrenta a las bases de datos, **(ii)** los *ecoparálogos* provisionales deberán tener estructuras secundaria y terciaria equivalentes, **(iii)** se deben mostrar diferencias en la adaptación o resistencia ante algún parámetro ecológico determinado. Algunos ejemplos podrían ser las variaciones en la densidad de residuos ácidos en las secuencias de procariotas halófilos ó variación del grado de resistencia a la temperatura en organismos termófilos. Hay otras consideraciones adicionales. Al realizar la misma función, la similitud de secuencia entre los genes *ecoparálogos* suele ser muy alta (comprendida entre 45-95 %), en comparación con los genes parálogos que presentan funciones divergentes (entre 30-45 %). Además, se observa actividad o expresión diferencial de los genes *ecoparálogos* bajo el parámetro ecológico considerado. De este modo, si los genes *ecoparálogos* se encuentran altamente regulados, normalmente existirán diferencias en la transcripción o traducción. Si no, simplemente trabajarían con diferente eficiencia en las distintas condiciones a las que se someta su exposición.

**2.1.1. Origen evolutivo de la *ecoparalogía*.** Aunque el mecanismo más sencillo de entender para la *ecoparalogía* sería la duplicación de un gen ancestral y su consiguiente divergencia funcional en un mismo organismo, los eventos de

transferencia horizontal de genes de la misma familia o *pseudoparálogos* (Koonin, 2005) juegan un papel crucial (Lercher y Pal, 2008). De este modo, en el único trabajo donde se estudia *in silico* este aspecto (Sanchez-Perez *et al.*, 2008), se pudo determinar que los genes *ecoparálogos* provenientes de supuestos eventos de transferencia horizontal suponían más de un 60 % en los organismos estudiados (*S. ruber*, *H. marismortui* y *Chlorobium tepidum*).

## 2.2. Transferencia horizontal de genes

La transferencia genética horizontal está considerada como el evento de mayor contribución a las innovaciones evolutivas en los linajes bacterianos (Ochman *et al.*, 2000; Koonin *et al.*, 2001; Gogarten *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2002; Daubin *et al.*, 2003; Koonin, 2003a, b; Nakamura *et al.*, 2004; Lerat y Ochman, 2005; Lercher y Pal, 2008). El proceso comprende 3 etapas consecutivas: **(i)** la transferencia física del ADN al repertorio genético de la célula huésped, **(ii)** la propagación de la nueva variante a través de la población bacteriana; esta etapa de fijación se debe a las ventajas selectivas que proporciona el ADN transferido y por tanto se asocia con una integración funcional del nuevo gen dentro del ambiente celular, y **(iii)** el ajuste de las interacciones bioquímicas, causado por la presión selectiva para optimizar la integración funcional y el uso de los recursos del nuevo gen.



**Fig. 3. Diferencias entre los distintos fenómenos de homología de secuencias de ADN.** (i) A, A' y B → genes homólogos; (ii) mismo color y letra → misma función; (iii) diferente color y letra → diferente función y (iv) mismo color y diferente letra → misma función bajo diferentes condiciones ambientales.



**2.2.1. Transferencia horizontal en *P. putida* KT2440.** Existen diferentes métodos para la detección de genes transferidos de manera horizontal (Gogarten *et al.*, 2002). Los más extendidos se basan en (i) una composición de la secuencia atípica, (ii) una irregular o limitada distribución entre especies relacionadas o (iii) incongruencia entre la filogenia del gen y la especie en cuestión.

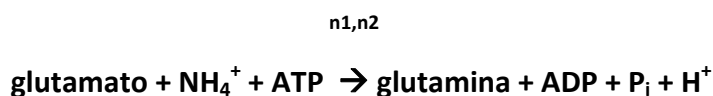
En el caso de *P. putida* KT2440, se utilizó la composición de G+C y el contenido en di- y tetranucleótidos en el análisis de su secuencia para observar que aproximadamente el 80 % del cromosoma presenta valores similares para ambos parámetros (Weinel *et al.*, 2002). De entre las 105 islas con contenidos atípicos en G+C y/o distribución de oligonucleótidos, se caracterizaron 29 islas genéticas con claros rasgos identificadores de elementos móviles como fagos, transposones, secuencias de inserción e intrones del grupo II, característicos de la transferencia horizontal de genes (Weinel *et al.*, 2002). La mayor parte de los genes codificados en estas regiones se encuentran relacionados con la entrada y degradación de compuestos químicos orgánicos, transporte de iones, síntesis y secreción de metabolitos secundarios y resistencia y defensa ante agentes tóxicos (Weinel *et al.*, 2002).

### **3. Fosfinotricina (PPT) y Metionina sulfoximina (MetSox)**

#### **3.1. Fosfinotricina (PPT)**

La fosfinotricina [PPT; ácido *L*-homoalanina-4-il(metil) fosfínico] es un compuesto natural producido por varias especies de *Streptomyces*. Fue aislado en un principio a partir de *S. viridochromogenes* y caracterizado como antibiótico (Bayer *et al.*, 1972). La *L*-PPT, por sí misma, se considera un potente inhibidor de la enzima glutamina sintetasa [GS; (Calanduoni, 1986; Gill y Eisenberg, 2001)] debido a su alta analogía con el glutamato (uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas, crítico para la función celular) por lo que a día de hoy tanto ella como su sal de amonio (glufosinato) constituyen el ingrediente activo de varios herbicidas comerciales (Basta®, Rely®, Finale®, Challenge® y Liberty®; Schwartz *et al.*, 2004). Cuando se inhibe la actividad de la GS, disminuyen los valores de glutamina y se impide el crecimiento celular, llevando a la célula a la muerte (Ramos *et al.*, 1991). La reacción que cataliza la GS es la condensación de amonio y glutamato dependiente de ATP, para formar

glutamina, ADP y fosfato libre (Meister *et al.*, 1962). La reacción bioquímica se puede escribir como:



donde n1 y n2 pueden ser tanto iones de magnesio como de manganeso. Una vez conocida la estructura cristalina de la PPT en el sitio activo de la GS de *Salmonella typhimurium* (Gill y Eisenberg, 2001), se pudo determinar que la inhibición no es covalente, ocupando la PPT el bolsillo del glutamato y estabilizando el residuo Glu327 en una posición que bloquea la entrada del mismo a su centro activo.

### 3.1.1. Efectos de la PPT sobre diferentes grupos de microorganismos del suelo.

Existen muy pocos trabajos sobre la resistencia de los microorganismos del suelo a los diferentes compuestos derivados de L-PPT (Bartsch y Tebbe, 1989; Ramos *et al.*, 1991; Ahmad, 1995; Ismail, 1995) con resultados, en algunos casos, contradictorios. Recientemente se ha publicado un artículo donde se indican los efectos perjudiciales del glufosinato sobre los microbios del suelo y fundamentalmente sobre sus actividades (Pampulha *et al.*, 2007). En él se detalla cómo la presencia del herbicida induce cambios significativos en la estructura de las comunidades con efectos duraderos. Se estudiaron las poblaciones microbianas mayoritarias del suelo como bacterias heterotróficas aerobias, hongos y actinomicetos, observando cómo la presencia de glufosinato reduce las poblaciones entre un 30-60 % tras 40 días desde su adición. Además, la actividad deshidrogenasa se vio reducida entre un 67-90 % (respecto del control sin glufosinato) tras 20 días de la aplicación del herbicida, indicando así un efecto inhibitorio severo en la actividad del enzima (Pampulha *et al.*, 2007).

**3.1.2. Etapas en la degradación de la PPT.** Existen 2 metabolitos principales de la L-PPT, derivados de 3 reacciones enzimáticas diferentes (Bartsch y Tebbe, 1989) descritos en la **Fig. 4**. Encontramos **(i)** N-acetil-PPT a partir de una **reacción acetiltransferasa** utilizando PPT y CoA; y **(ii)** ácido butírico 2-oxo-4[(hidroxi)(metil)fosfinoil] (PPO) por **transaminación** o bien **desaminación oxidativa** de

la PPT. En la **Tabla 1** se pueden observar la distribución de enzimas capaces de transformar PPT de algunas especies bacterianas.

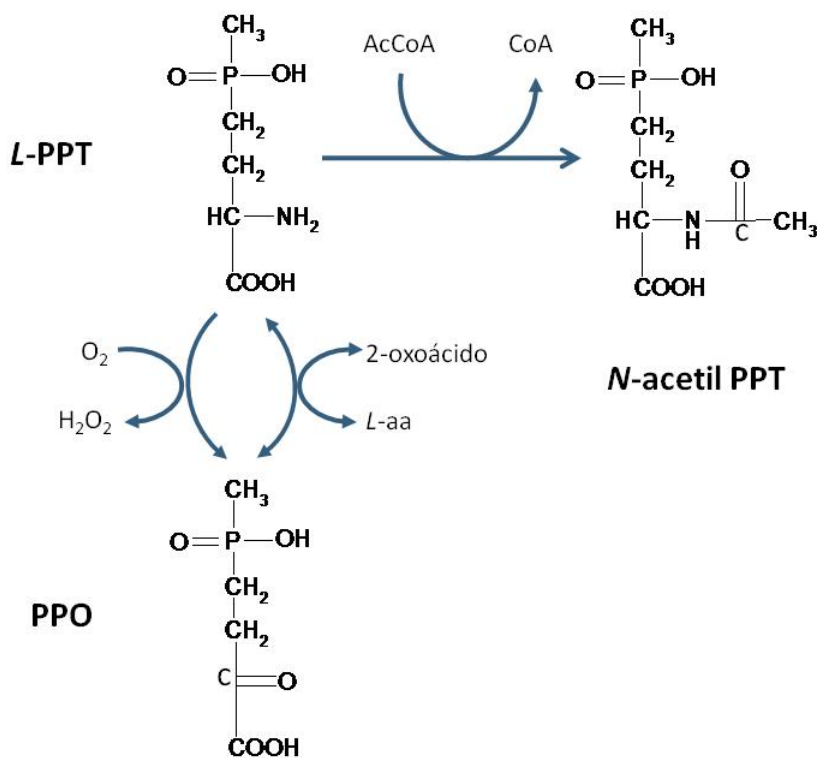
**Tabla 1. Actividades enzimáticas que actúan sobre la PPT en diferentes organismos.** Tabla adaptada de (Bartsch y Tebbe, 1989).

Fenotipo	Cepa	Actividad sobre la PPT		
		Oxidasa	N-acetil transferasa	Transaminasa
Resistente a PPT (PPT como fuente de N)	<i>Rhodococcus</i> sp.	+	+	+
Resistente a PPT (no usa a PPT como fuente de N)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	+	+
	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	-	+	+
	<i>Serratia plymuthica</i>	-	+	+
	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	+
	<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	+
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	+
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	+	+
Sensible a PPT	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+

**PPT-N acetiltransferasas. Descripción y anotación errónea.** El enzima PPT-N-acetil transferasa (conocido como PAT), constituye uno de los mecanismos de transformación de la PPT más extendidos entre bacterias. El primer organismo de donde se aisló fue de *S. viridochromogenes* y se comprobó su eficiencia en base a su capacidad para conferir resistencia a PPT en *Streptomyces lividans* (Strauch *et al.*, 1988). A partir de ese punto, PAT ha sido aprovechada ampliamente para transformar un extenso rango de plantas y poder utilizar de manera eficiente los herbicidas que contienen a la PPT como su ingrediente activo (Wohlleben *et al.*, 1988). Todo ello se vio además beneficiado por la seguridad que representa el enzima, ya que no supone ningún riesgo en la ingesta de animales a partir de plantas modificadas genéticamente, es altamente específico de su sustrato y no posee características asociadas con toxinas o alergénicos (Herouet *et al.*, 2005).

Sin embargo, existen multitud de enzimas presentes en las bases de datos anotadas como hipotéticas, putativas y propiamente dichas PPT-N-acetil transferasas en base a la similitud de secuencia respecto de las previamente descritas de distintas especies de *Streptomyces* que realmente no lo son. En estudios recientes se ha revelado que *Pseudomonas aeruginosa* posee un enzima anotado como PAT que no actúa sobre la

PPT sino que lo hace sobre *L*-MetSox y *L*-Metionina sulfona (*L*-MetSon), agentes que también inhiben la actividad de la GS como se ve en la **Fig. 5** (Davies *et al.*, 2007). Lo mismo ocurre con la proteína producto del gen ACIAD1637 de *Acinetobacter baylyi* ADP1. De nuevo son tanto *L*-MetSox como *L*-MetSon los sustratos del enzima indicado en lugar de la PPT (Davies *et al.*, 2009).



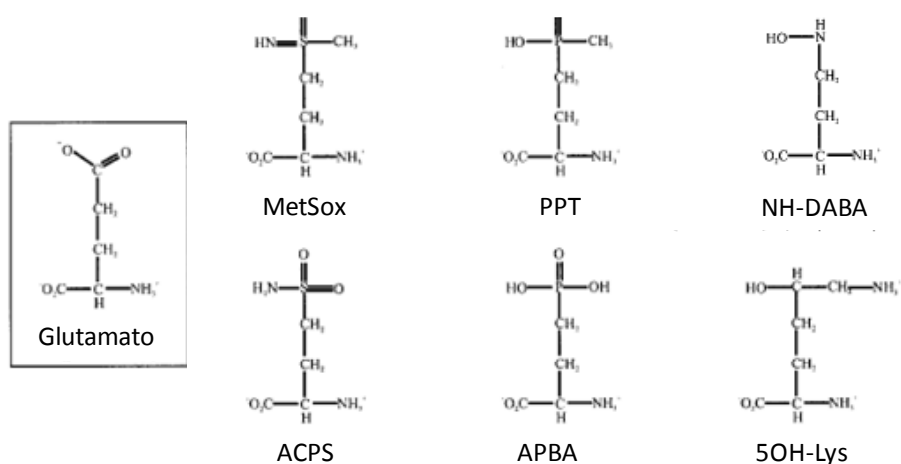
**Fig. 4.** Etapas iniciales en la degradación de PPT por parte de microorganismos del suelo. Adaptada de Bartsch y Tebbe (1989).

### 3.2. Metionina sulfoximina (MetSox)

La *L*-Metionina sulfoximina (MetSox), como la *L*-PPT, es un análogo del glutamato (Thompson *et al.*, 1987) con neurotoxicidad en animales debido a la inhibición de la GS en el cerebro (Rowe y Meister, 1970; Griffith y Meister, 1978). Su toxicidad afecta a un amplio y diverso rango de especies desde procariotas hasta eucariotas (Marek y Dickson, 1987; Poitry *et al.*, 2000; Gill y Eisenberg, 2001) y su interacción con el centro activo de la GS es idéntico al que posee la PPT (Gill y Eisenberg, 2001; Maughan y Cobbett, 2003), estabilizando el aminoácido Glu327 y el bucle que se forma en el Asn264 de la misma forma. Es uno de los llamados *aminoácidos raros* y se puede

encontrar de manera natural (frecuente en la corteza y raíces de plantas del género *Connaraceae*; Chevrier, 1986) o bien como producto intermedio en el procesado de algunos alimentos (Shaw *et al.*, 1999).

Existen además otros inhibidores para la GS aparte de la PPT y MetSox (**Fig. 5**) basados en la analogía de la molécula como son: NH-DABA, 5OH-Lys, ACPS y APBA (Gill y Eisenberg, 2001).



**Fig. 5. Inhibidores de la GS.** Se muestran análogos del glutamato con alta capacidad para inhibir la enzima GS. NH-DABA (ácido 4-*N*-hidroxi-L-2,4-diaminobutírico), ACPS (sulfanamida 3-amino-3-carboxipropano), APBA (ácido 2-amino-4-fosfonobutírico), 5OH-Lys ( $\delta$ -alohidroxilisina).

Tal y como se desarrollará en las Secciones siguientes de esta memoria, el trabajo realizado presenta la interconexión de los puntos principales de la introducción en el organismo modelo *P. putida* KT2440. El motivo de la redundancia genética en relación a los operones *ars* de resistencia a arsénico así como la tolerancia al herbicida Fosfinotricina vinculada a la presencia del metaloide y los mecanismos de regulación de los sistemas, constituyen los puntos principales de interés sobre los que se tratará en profundidad a lo largo de esta Tesis.



## **II. OBJETIVOS**





Dado que *P. putida* KT2440 es una bacteria ubicua del suelo, no patógena, de fácil manejo en el laboratorio que posee **(i)** un inesperado número de ORFs en relación con la resistencia a metales pesados y metaloides, así como **(ii)** la presencia específica de 2 operones *ars* anotados en su genoma, este trabajo se propuso como

**Objetivo general:**

La caracterización de los mecanismos de resistencia a arsénico en *P. putida* KT2440.

A través de los siguientes **objetivos específicos**:

1. La descripción de los genes que determinan la resistencia al metaloide y el estudio de la regulación compleja de los mismos.
2. La búsqueda e identificación de nuevos genes involucrados en la tolerancia a arsénico en el genoma de *P. putida* KT2440.
3. La tipificación de posibles genes vinculados a otras resistencias dependientes de la regulación por arsénico.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli* utilizadas en el presente trabajo se describen en la **Tabla 2**, junto con sus características genotípicas más relevantes.

**TABLA 2.** Cepas de *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli*

<i>P. putida</i>	Características relevantes	Referencia
<b>KT2440</b>	Derivada de <i>P. putida</i> mt-2 sin el plásmido pWW0	Nelson <i>et al.</i> , 2002
<b>TEC1</b>	Rif <sup>r</sup> ; <i>P. putida</i> KT2442 con una delección interna del gen <i>pyrF</i>	Galvao y de Lorenzo, 2005
<b><math>\Delta ars1</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo operón <i>ars1</i> fue eliminado usando pTUD1	Este trabajo
<b><math>\Delta ars2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo operón <i>ars2</i> fue eliminado usando pTUD2	Este trabajo
<b><math>\Delta ars1\Delta ars2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyos operones <i>ars1</i> y 2 fueron eliminados usando pTUD1 y pTUD2	Este trabajo
<b><math>\Delta R1</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo gen <i>arsR1</i> fue eliminado usando pTUDR1	Este trabajo
<b><math>\Delta R2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo gen <i>arsR2</i> fue eliminado usando pTUDR2	Este trabajo
<b><math>\Delta R1\Delta R2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyos genes <i>arsR1</i> y <i>arsR2</i> fueron eliminados usando pTUDR1 y pTUDR2	Este trabajo
<b><math>\Delta H1</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo gen <i>arsH1</i> fue eliminado usando pTUDH1	Este trabajo
<b><math>\Delta H2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo gen <i>arsH2</i> fue eliminado usando pTUDH2	Este trabajo
<b><math>\Delta H1\Delta H2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyos genes <i>arsH1</i> y <i>arsH2</i> fueron eliminados usando pTUDH1 y pTUDH2	Este trabajo
<b><math>\Delta phoN1</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo gen <i>phoN1</i> fue eliminado usando pTUDPPT1	Este trabajo
<b><math>\Delta phoN2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyo gen <i>phoN2</i> fue eliminado usando pTUDPPT2	Este trabajo
<b><math>\Delta phoN1\Delta phoN2</math></b>	Rif <sup>r</sup> ; TEC1 cuyos genes <i>phoN1</i> y <i>phoN2</i> fueron eliminados usando pTUDPPT1 y pTUDPPT2	Este trabajo

<i>E. coli</i>	Características relevantes	Referencia
<b>CC118</b>	$\Delta(\text{ara-leu})$ , <i>araD</i> , <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> , <i>recA1</i>	Manoil y Beckwith, 1985
<b>CC118<math>\lambda</math>pir</b>	$\Delta(\text{ara-leu})$ , <i>araD</i> , <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> , <i>recA1</i> , lisogeno $\lambda$ pir	Herrero <i>et al.</i> , 1990
<b>HB101</b>	$\text{Sm}^r$ ; <i>rpsL</i> <i>recA</i> <i>thi</i> <i>pro</i> <i>leu</i> <i>hsdR</i> $M^+$ ( <i>E. coli</i> K-12/ <i>E. coli</i> B. híbrido)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d [ <i>lacZ</i> $\Delta$ M $\Delta$ 15], $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ , $\Delta$ U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , $R^+M^+$ , <i>supE44</i> , <i>thiI</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>	Hanahan, 1983
<b>JM109</b>	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rk</i> <sup>-</sup> , <i>mk</i> <sup>+</sup> ), <i>el4</i> <sup>-</sup> , ( <i>mcrA</i> <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(\text{proAB, lac})$ , <i>F'</i> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>traD36</i> , <i>lacI</i> <sup>f</sup> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<b>W3110</b>	K12 F-IN ( <i>rrnD-rrnE</i> )	Bachmann, 1987
<b>AW3110</b>	$\Delta\text{arsRBC::cam}$ F-IN ( <i>rrnD-rrnE</i> )	Carlin <i>et al.</i> , 1995

## 2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *P. putida* y *E. coli* se cultivaron a 30° y 37°C, respectivamente, en un agitador orbital a 170 rpm. En experimentos puntuales, indicados en cada caso, se utilizó la temperatura de 15°C para el crecimiento de distintas cepas de *P. putida*. El medio rico utilizado para cultivar todas las cepas del presente trabajo fue Luria-Bertani (LB) descrito en Sambrook *et al.*, (1989). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB suplementado con Bacto Agar (Pronadisa) al 1.5 % (p/v). Cuando fue necesario, se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) a una concentración de 0.08 mM, así como isopropil-1-tio- $\beta$ -galactopiranosido (IPTG) a una concentración entre 1 y 0.01 mM. Además, las distintas cepas de *P. putida* también se cultivaron, cuando fue oportuno, en medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con citrato como fuente de carbono (0.2 %) y  $\text{MgSO}_4$  (2 mM). Cuando se utilizó el medio M9 para *E. coli*, la fuente de carbono elegida fue glucosa y se suplementó con tiamina (0.2 ‰), casaminoácidos (0.1 %) y  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ). Las soluciones concentradas de las diferentes fuentes de carbono fueron esterilizadas en autoclave y añadidas al medio de cultivo de forma aseptica. Tanto el citrato como la glucosa se añadieron al cultivo a una concentración de 0.2 % (p/v). Los cultivos en medio mínimo sólido se realizaron suplementando el medio M9 y su fuente de

carbón con Bacto Agar al 1.5 % (p/v). Los antibióticos se prepararon en soluciones concentradas (1000x), fueron esterilizados por filtración y se conservaron a -20°C. La utilización de los mismos fue a las siguientes concentraciones finales; ampicilina (Ap, 150 µg / ml), kanamicina (Km, 50 µg / ml), cloramfenicol (Cm, 30 µg / ml) y gentamicina (Gm, 10 µg / ml). Las cepas  $\Delta pyrF$  de *P. putida* fueron suplementadas con uracilo (Sigma Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 20 µg/ml. El ácido 5-Fluoroorótico (FOA; Zymo Research), utilizado en la obtención de cepas mutantes, se usó a 250 µg/ml. El arsenito (NaH<sub>2</sub>AsO<sub>3</sub>) y arsenato (NaH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>), ambos de SIGMA, se almacenaron en solución 2M y 1M, respectivamente. Ambos fueron esterilizados por filtración y en el caso del arsenito almacenado en oscuridad y a 4°C para evitar su posible oxidación. Los dos fueron aplicados a las distintas concentraciones descritas en el trabajo. Durante periodos inferiores a un mes, las cepas se conservaron a 4°C en placas de agar-LB o medio mínimo. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm ( $A_{600}$ ) empleando un espectrofotómetro *Ultrospec-3000 pro*. Para la conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 20 % (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

### 3. Plásmidos

La **Tabla 3** recoge los plásmidos utilizados en este trabajo detallando sus características principales.

**TABLA 3. Plásmidos**

Plásmido	Características relevantes	Referencia
<b>pGEM-T Easy</b>	Ap <sup>r</sup> ; plásmido de clonación de fragmentos de PCR	Promega
<b>pVLT33</b>	Km <sup>r</sup> ; Vector de expresión de amplio espectro de hospedador RSF1010/ <i>lacI</i> <sup>q</sup> / promotor híbrido <i>Ptac</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
<b>pTEC</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; ligación de MCS-Km-MCS, <i>oriR6K</i> /origen de transferencia <i>mobRK2</i> . Contiene el gen <i>pyrF</i> clonado	Galvao y de Lorenzo, 2005
<b>pRK600</b>	Cm <sup>r</sup> ; <i>ori</i> ColE1, <i>mobRK2</i> , <i>traRK2</i>	Kessler <i>et al.</i> , 1992
<b>pUCP24</b>	Gm <sup>r</sup> ; plásmido basado en pUC18, de expresión en <i>Escherichia-Pseudomonas</i> (ColE1-RO1600)	West <i>et al.</i> , 1994

<b>pMAL-C2T</b>	pMALC2X ( <i>New England Biolabs</i> ) con la sustitución del sitio de reconocimiento del factor Xa por un sitio de corte de la proteasa trombina	Belén Calles
<b>pGCI1</b>	Ap <sup>r</sup> ; pGEM-T Easy que contiene el operón <i>ars1</i> de KT2440 (con su promotor endógeno), clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 3.13 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pGCI2</b>	Ap <sup>r</sup> ; pGEM-T Easy que contiene el operón <i>ars2</i> de KT2440 (con su promotor endógeno), clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 3.11 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pTUD1</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 1.29 kb arriba y 1.24 kb abajo del operón <i>ars1</i> , clonadas secuencialmente como un fragmento <i>NotI/XbaI</i> y <i>XbaI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pTUD2</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 0.88 kb arriba y 1.19 kb abajo del operón <i>ars2</i> , clonadas secuencialmente como un fragmento <i>NotI/XbaI</i> y <i>XbaI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pTUDR1</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 0.69 kb arriba y 0.54 kb abajo del gen <i>arsR1</i> , clonadas como un fragmento de 1.23 kb <i>NotI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pTUDR2</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 0.54 kb arriba y 0.61 kb abajo del gen <i>arsR2</i> , clonadas como un fragmento de 1.15 kb <i>NotI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pTUDH1</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 1.27 kb arriba y 0.90 kb abajo del gen <i>arsH1</i> , clonadas como un fragmento de 2.17 kb <i>NotI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pTUDH2</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 0.94 kb arriba y 0.77 kb abajo del gen <i>arsH2</i> , clonadas como un fragmento de 1.71 kb <i>NotI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pTUDPPT1</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 1.07 kb arriba y 1.08 kb abajo del gen <i>phoN1</i> , clonadas secuencialmente como un fragmento <i>NotI/XbaI</i> y	Este trabajo



	<i>XbaI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	
<b>pTUDPPT2</b>	Km <sup>r</sup> FOA <sup>s</sup> Ura <sup>+</sup> ; pTEC conteniendo la región de 1.29 kb arriba y 1.08 kb abajo del gen <i>phoN2</i> , clonadas secuencialmente como un fragmento <i>NotI/XbaI</i> y <i>XbaI/SacI</i> procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVCI1</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el operón <i>ars1</i> de la estirpe TEC1 incluyendo el putativo promotor <i>Pars1</i> , clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 3.1 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVCI2</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el operón <i>ars2</i> de la estirpe TEC1 incluyendo el putativo promotor <i>Pars2</i> , clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 3.1 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVR1</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el gen <i>arsR1</i> de la estirpe TEC1 incluyendo el putativo promotor <i>Pars1</i> , clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.5 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVR2</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el gen <i>arsR2</i> de la estirpe TEC1 incluyendo el putativo promotor <i>Pars2</i> , clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.5 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVH1</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el gen <i>arsH1</i> de la estirpe TEC1 incluyendo su propia RBS, clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.72 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVH2</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el gen <i>arsH2</i> de la estirpe TEC1 incluyendo su propia RBS, clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.71 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVPPT1</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el gen <i>phoN1</i> de la estirpe TEC1 incluyendo su propia RBS, clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.55 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pVPPT2</b>	Km <sup>r</sup> ; pVLT33 conteniendo el gen <i>phoN2</i> de la estirpe TEC1 incluyendo su propia RBS, clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.51 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pUCP-ArsN</b>	Gm <sup>r</sup> ; pUCP24 conteniendo el gen <i>arsN</i> de la estirpe TEC1	Este trabajo

---

	incluyendo su propia RBS, clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.53 kb procedente de ADN genómico por PCR	
<b>pMALR1</b>	Ap <sup>r</sup> , pMAL-C2T conteniendo el gen <i>arsR1</i> fusionado a MBP, clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.36 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo
<b>pMALR2</b>	Ap <sup>r</sup> , pMAL-C2T conteniendo el gen <i>arsR2</i> fusionado a MBP, clonado como un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 0.34 kb procedente de ADN genómico por PCR	Este trabajo

---

#### 4. Transformación de las células

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl (Sambrook, 1989) o bien mediante electroporación (Wirth *et al.*, 1989). En el caso de las cepas de *P. putida*, la obtención de células electrocompetentes se realizó a temperatura ambiente y a partir de lavados con sacarosa 300 mM (Choi *et al.*, 2006). Para la electroporación se empleó un equipo Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones: 2.5 kV, 25  $\mu$ F, 200 Ohms.

#### 5. Transferencia de plásmidos por conjugación

Los plásmidos fueron movilizados de cepas de *E. coli* a cepas de *P. putida* por conjugación tri-parental con filtros de membrana (0,45  $\mu$ m, Millipore) siendo la cepa *helper E. coli* HB101 (pRK600) descrita en Kessler *et al.*, (1992). Después de 8 horas de incubación a 30°C en LB agar, los transconjugantes fueron seleccionados en placas de medio mínimo conteniendo citrato al 0.2 % y el antibiótico correspondiente.

#### 6. Técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas utilizadas para la preparación y manipulación del ADN han sido descritas por Sambrook *et al.*, (1989). Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas de la casa comercial *New England Biolabs*. Las digestiones se realizaron siempre a 37°C durante 2 h. Para las reacciones de ligación de ADN fue utilizada la enzima ligasa T4 y, se realizaron teniendo en cuenta una proporción 3/1 inserto/vector e incubando la mezcla de reacción durante 12 h a 16°C. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a

las especificaciones del fabricante. Los fragmentos de ADN se purificaron empleando geles de agarosa, utilizando el *Kit* comercial *QiAEX®II Gel extraction Kit QIAGEN* (Cat. #20021) mediante el cual se disuelve la agarosa con INa y se retiene el ADN en una matriz, donde se lava, y desde la que se puede eluir.

**6.1. Aislamiento de ADN genómico y plasmídico.** El ADN genómico de *P. putida*, utilizado en amplificaciones por PCR, se obtuvo según el protocolo descrito por Murray y Thompson (1980) donde se utiliza la técnica de extracción con bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB)/NaCl. La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo, empleando la lisis alcalina, con el *Kit* comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN* (Cat. #27106), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

**6.2. Diseño de oligonucleótidos.** Se llevó a cabo a partir de la secuencia de ADN de interés utilizando los programas de análisis *Primer3* (Rozen y Skaletsky, 2000) y *ApE-A Plasmid Editor v1.12* (Copyright® 2003-2005, M. Wayne Davis). Se verificó en todos los casos que los oligos utilizados para la reacción de PCR sólo hibridasen en la región deseada, así como evitar interacciones entre ellos. A tal efecto, también se utilizó el *software* de libre acceso *OligoCalc* (Kibbe, 2007). La Temperatura de hibridación ( $T_m$ ) se situó en todos los casos por encima de 55°C. La síntesis fue llevada a cabo por Sigma-Genosys. Todos los oligonucleótidos empleados se detallan en la **Tabla 4**.

**TABLA 4. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR.** Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción creadas, que son diferentes en cada caso.

Oligo	Secuencia (5'-3')
oFWDArs1Up	TCGAAGCGGCCGCACCACTGAGGGCACCATGAC
oRVSArs1Up	CGGTCTATTCTAGATAATGAGCATGTCGCATCCCCGCGC
oFWDArs1Down	TCTAGATCCTATACTGGGCGTCGATACC
oRVSArs1Down	GGTAGAGCTCAATGCTCTGCTCGATTTGCTGC
oFWDArs2Up	GCGGCCGCGGCGTGAGTTGGCTGACC

<b>oRVSArs2Down</b>	CGCTCCCCCATCTAGATAAGCCAGTG
<b>oFWDArs2Up</b>	TCTAGATGTGCTAGCAAGCCTTCCTGG
<b>oRVSArs2Down</b>	ATGTTT <u>AGTACT</u> CGCTTCGATGGAG
<b>oFWDPPT1Up</b>	CCATGGCGGCCGCAGGCGAACTAC
<b>oRVSPPT1Up</b>	CGATTCCGCTCTAGAGCCGGCTGC
<b>oFWDPPT1Down</b>	GCCTCTCTAGAGTGTCCAGTGAG
<b>oRVSPPT1Down</b>	CCGCACCGGGAGCTCCTGAGTCTG
<b>oFWDPPT2Up</b>	CAGCGCGGCCGCGCGTCTGAGCGG
<b>oRVSPPT2Up</b>	CGTAGCTCTAGACAGCGTCTCGC
<b>oFWDPPT2Down</b>	GTGAGCATCTAGAAAGGGCTGC
<b>oRVSPPT2Down</b>	CTTCTTGAGCTCGGTCTTCGGTGG
<b>oFWDR1Up</b>	CCACCAGCGGCCGCTCCTGGGACACCTGAGAACGAACTC
<b>oRVSR1Up</b>	ACTACAACTCAATCAGCGAAGGGAAGTCGTGACCTCCTGGGAATGCGCGTA
<b>oFWDR1Down</b>	GACTTCCCTTCGCTGATTGAGTTGTAGT
<b>oRVSR1Down</b>	GTCCC <u>GAGCT</u> CCGTACTCGCTGAAACCGATGCCGAA
<b>oFWDR2Up</b>	CCACCTGCGGCCGCACCGAATACACGGGTGAACTGCCG
<b>oRVSR2Up</b>	GCAGCATGAAAATCTCGCTTGGTGATGAGGGGGTGCTGTACATACGGAAAAC
<b>oFWDR2Down</b>	TCATCACCAAGCGAGATTTTCATGCTGC
<b>oRVSR2Down</b>	GTCCC <u>GAGCT</u> CTACAGGAATAGCACCAGCAGGGTGG
<b>oFWDH1Up</b>	CCACCAGCGGCCGCTCGGCATCGGTTTCAGCGAGTACG
<b>oRVSH1Up</b>	TGATCCAGGGCCTACAGCGCG
<b>oFWDH1Down</b>	CGCGCTGTAGGCCCTGGATCAGATAATGAGCATGTGCGATCCTTACTCATTG
<b>oRVSH1Down</b>	GTCCC <u>GAGCT</u> CCGTTGCGCTGATGACGACACGAG
<b>oFWDH2Up</b>	TCAACTGCGGCCGCATATTTTCGCTGGGCATGTATCTGGTGG
<b>oRVSH2Up</b>	GTTTTCTTCCTGTTCAAAGCGAGCCGAT
<b>oFWDH2Down</b>	ATCGGCTCGCTTTGAACAGGAAGAAAACAGCAAAGGTGATTCAAGACAGTGGA AACG

<b>oRVSH2Down</b>	GTCCCGAGCTCTGGCCAATGTCATCCGCAGGCG
<b>oFWDArs1</b>	CGGCAAGCTTGAGCGTATCCAGGC
<b>oRVSArs1</b>	CGTCCCGGAATTCGAGGCGATTG
<b>oFWDArs2</b>	GGTGCAAGCTTTGGGCTGTCCATCG
<b>oRVSArs2</b>	TCGACCGAATTCCTGGCGACG
<b>oFWDPPT1</b>	GTAGTTGAATTCCTGAACAGCTTGGAGC
<b>oRVSPPT1</b>	CGCGGAAGCTTGTCAAACTCACTGGG
<b>oFWDPPT2</b>	GGTAAGAATTCATCTGCGAGCAACGACC
<b>oRVSPPT2</b>	CGGGGAAGCTTTCAGCCCTTTCGC
<b>oFWDR1</b>	CGACGGAATTCATAGGACCCAGAGCGCGGG
<b>oRVSR1</b>	TCAGCGAAGCTTAGTCTCAAGCACAAGCAACAGG
<b>oFWDR2</b>	CAAGCGAATTCACCCTGCATTGCCATCAGCG
<b>oRVSR2</b>	ATAAGAAGCTTCAGCATGAAAATCTCGCTTGGTG
<b>oFWDH1</b>	CGACGGAATTCGCGCGCTGTAGGCCCTGGATC
<b>oRVSH1</b>	TCAGCGAAGCTTGCGACATGCTCATTATCTCAAATAGACCG
<b>oFWDH2</b>	CTTCGGAATTCCTGGATCGCATCGGCTCGCTTTG
<b>oRVSH2</b>	TCAGAGAAGCTTCGTTTCCACTGTCTTGAATCACCTTTGC
<b>oFWDB1</b>	TGTGATTTCTACCCGCAAG
<b>oRVSB1</b>	GGCGAAAACATTGAGGATC
<b>oFWDB2</b>	TCAACCCGTCGCGTGCTG
<b>oRVSB2</b>	TCCAGCAGGTGGGTGAGC
<b>oFWDRpoN</b>	CAACGATGACGACGAATGG
<b>oRVSRpoN</b>	ATCAGGGTCACGGCAATC
<b>oFWDArsN</b>	CGACGGAATTCATACCACCCCAGAGTCGCCAATG
<b>oRVSArsN</b>	TCAGCGAAGCTTTCCTACTGACGTCCGTGGAGG
<b>oFWDR1-fus</b>	TGAGAATTCATGCGAGAAATACTGACTCCCCC
<b>oRVSR1-fus</b>	AAGGGTCGACTCAAGCACAAGCAACAGGGCTCT

<b>oFWDR2-fus</b>	TGCGAATTCATGATCACACCGCCCGATGTCTTC
-------------------	-----------------------------------

<b>oRVSR2-fus</b>	TTGGGTCGACTCAGCAGCAGACGGAATCACGC
-------------------	----------------------------------

**6.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).** La amplificación del ADN se realizó en un termociclador *iCycler* de Bio-Rad. Las enzimas que se emplearon fueron la *Taq* polimerasa y la *Pfu* polimerasa, ambas de la casa comercial Promega. Las mezclas de reacción contenían  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM y dNTPs 0.2 mM. En los casos donde se utilizó ADN genómico como molde, éste se utilizó a una concentración de entre 5-50 ng/ $\mu\text{l}$  y, si el molde usado era ADN plasmídico, a 10 ng/ $\mu\text{l}$ . Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se añadieron a la concentración de 0.25  $\mu\text{M}$  y todos fueron sintetizados por *Sigma-Genosys*. El protocolo base de amplificación en el termociclador fue: **(i)** Desnaturalización inicial (4 min a 95°C). **(ii)** 25 ciclos de: desnaturalización (45 seg a 95°C), hibridación (45 seg a  $T_m$  del oligo) y extensión (a 72°C, el tiempo de extensión dependió del tamaño del fragmento a amplificar). **(iii)** Extensión final (7 min a 72°C). En muchas ocasiones la reacción de PCR se realizó a partir de ADN de una pequeña porción de una colonia (PCR **de colonia**) sustituyendo al ADN genómico, en condiciones de esterilidad. Los productos amplificados, en cualquier caso, se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* de Roche (Cat. 11 732 676 001).

**6.4. Secuenciación de ADN.** La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación y Diagnóstico Molecular (SECUGEN) del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CIB) utilizando el sistema BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1.

**6.5. Construcción de cepas mutantes de *P. putida* KT2440.** Todas las cepas mutantes realizadas en este trabajo se realizaron sobre un fondo TEC1 (KT2442  $\Delta\text{pyrF}::\text{Xyle}$ ). Esta cepa es auxótrofa para uracilo y resistente a FOA. El sistema utilizado fue una adaptación del sistema de selección *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae* y se encuentra detallado en Galvao y de Lorenzo (2005).

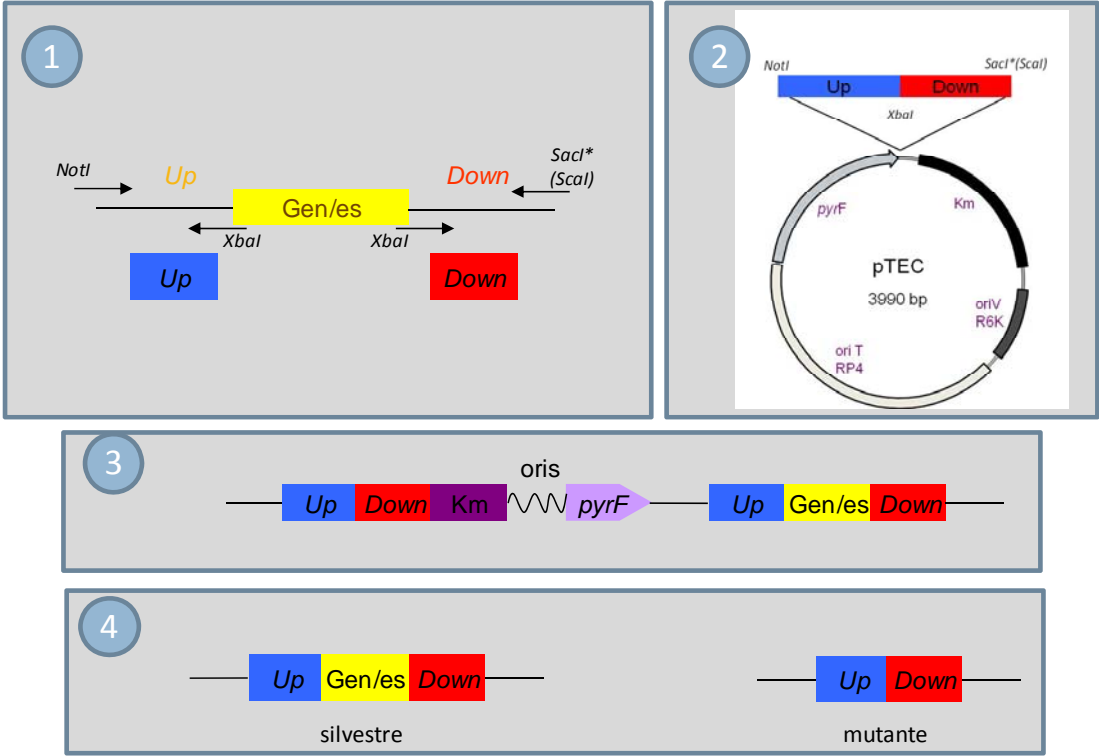
### 6.5.1. Construcción de $\Delta ars1$ , $\Delta ars2$ , $\Delta phoN1$ y $\Delta phoN2$

Las principales etapas para la obtención de estas cepas mutantes fueron las siguientes:

**(i)** Se amplificaron por PCR regiones de diferentes tamaños (**Tabla 5**), localizadas en el genoma inmediatamente arriba y abajo de la zona de interés a delecionar. De este modo se obtienen las llamadas regiones *Up* y *Down* para cada caso. **(ii)** Se clonaron los productos amplificados *Up* como productos *NotI XbaI* en el vector de clonación pTEC ( $Km^r$ , origen de replicación R6K y que complementa la delección en *pyrF*). Posteriormente fueron las regiones *Down* las que se introdujeron en el plásmido resultante anterior, utilizando los sitios de restricción *XbaI* y *SacI* (excepto para el mutante  $\Delta ars2$  que se clonó como *XbaI SacI*, al tener un sitio *SacI* en la secuencia de interés). Se obtuvieron así como resultado los distintos plásmidos pTUD que fueron transformados en la cepa de *E. coli* CC118 $\lambda pir$ . **(iii)** Se realiza una conjugación triparental entre TEC1 (cepa receptora), CC118 $\lambda pir$  (pTUD) como cepa donadora y HB101 (pRK600) como *helper*. Se seleccionaron entonces los cointegrados de *P. putida* en MM cit Km. Los cointegrados se resolvieron creciendo un conjunto de ellos en LB Ura (12 horas en cultivo líquido). **(iv)** Se plaquearon 100  $\mu$ l del cultivo líquido anterior en el medio selectivo MM cit Ura FOA para eliminar todos los cointegrados. Las colonias resultantes eran teóricamente una mezcla 50-50 % de cepas silvestres y cepas mutantes, cuyo fenotipo es Ura<sup>-</sup>, FOA<sup>+</sup>, Km<sup>-</sup>. **(v)** Se aislaron colonias (entre 8-20) y se buscaron las cepas mutantes por PCR de colonias.

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados y productos de PCR amplificados para obtener las distintas regiones *Up* y *Down* (Paso 1 en la construcción de los mutantes indicados).**

	Región <i>Up</i>		Región <i>Down</i>	
	Oligos	Producto de PCR	Oligos	Producto de PCR
$\Delta ars1$	FWDars1Up RVSArs1Up	1.29	FWDars1Down RVSArs1Down	1.24
$\Delta ars2$	FWDars2Up RVSArs2Up	1.19	FWDars2Down RVSArs2Down	0.88
$\Delta phoN1$	FWDPPT1Up RVSPPT1Up	1.09	FWDPPT1Down RVSPPT1Down	1.09
$\Delta phoN2$	FWDPPT2Up RVSPPT2Up	1.29	FWDPPT2Down RVSPPT2Down	1.08



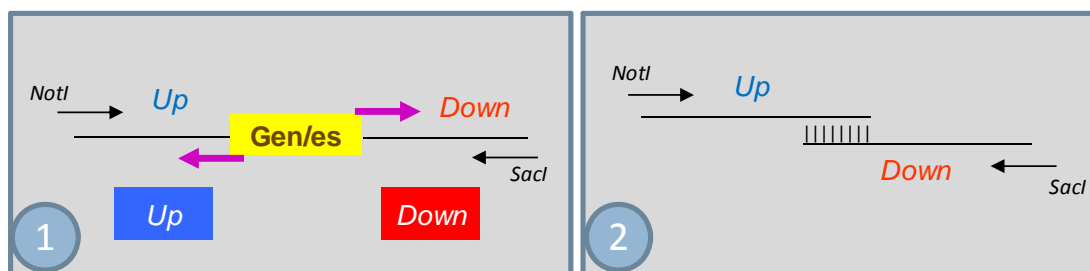
**Fig. 6. Esquema de la secuencia de construcción de los mutantes  $\Delta ars1$ ,  $\Delta ars2$ ,  $\Delta phoN1$  y  $\Delta phoN2$ .** El detalle de cada uno de los 4 pasos principales se detalla en el apartado 6.5.1. y siguen la misma numeración. Las cepas mutantes resultantes se comprobaron por PCR de las colonias que mostraban el fenotipo esperado.



**6.5.2. Construcción de  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$ ,  $\Delta H1$  y  $\Delta H2$ .** Para estas cepas mutantes se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 6.5.1, con la excepción de la manera de conseguir los plásmidos pTUD para cada caso. Así, se diseñaron un par de oligos para amplificar la región *Up* de cada cepa mutante, con la peculiaridad de ser el oligo reverso (oRVS---Up) el complementario del directo utilizado para amplificar la región *Down* (oFWD---Down). De este modo, se realizó una primera reacción de PCR para amplificar las regiones *Up* y *Down* de interés para, posteriormente utilizar los oligos más externos oFWD---Up y oRVS---Down y obtener así las regiones *Up* y *Down* flanqueadas por *NotI* y *SacI* (**Tabla 6**). Estas regiones se clonaron entonces en el vector de clonación pTEC y se obtuvieron así los oportunos pTUD's (**Fig. 7**).

**Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados y productos de la primera y segunda reacción de PCR para la construcción de las cepas mutantes de *P. putida* KT2440;  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$ ,  $\Delta H1$  y  $\Delta H2$ .** Se desarrollaron los plásmidos pTUD correspondientes en cada caso. Se obtuvieron las distintas regiones *Up* y *Down* independientes, que sirvieron de molde para la segunda reacción de PCR. El producto final son las diferentes regiones *Up-Down* que fueron clonadas en pTEC.

	Región <i>Up</i> (primera PCR)		Región <i>Down</i> (primera PCR)		Región <i>Up-Down</i> (segunda PCR)	
	Oligos	Producto de PCR (kb)	Oligos	Producto de PCR (kb)	Oligos	Producto de PCR (kb)
$\Delta R1$	FWDR1Up RVSR1Up	0.69	FWDR1Down RVSR1Down	0.55	FWDR1Up RVSR1Down	1.24
$\Delta R2$	FWDR2Up RVSR2Up	0.54	FWDR2Down RVSR2Down	0.61	FWDR1Up RVSR1Down	1.15
$\Delta H1$	FWDH1Up RVSH1Up	1.27	FWDH1Down RVSH1Down	0.90	FWDR1Up RVSR1Down	2.17
$\Delta H2$	FWDH2Up RVSH2Up	0.94	FWDH2Down RVSH2Down	0.77	FWDR1Up RVSR1Down	1.71



**Fig. 7. Esquema de las dos reacciones de PCR para amplificar las regiones Up y Down en los mutantes  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$ ,  $\Delta H1$  y  $\Delta H2$ .** Diseñando dos oligos complementarios (1) se evita una clonación en el vector pTEC. El producto resultante de la segunda reacción de PCR (2) se introduce en pTEC como un fragmento NotI SacI.

**6.5.3. Construcción de los dobles mutantes  $\Delta ars1\Delta ars2$ ,  $\Delta phoN1\Delta phoN2$ ,  $\Delta R1\Delta R2$  y  $\Delta H1\Delta H2$ .** Todos los mutantes dobles se realizaron utilizando la misma metodología que la descrita para los mutantes simples del sistema 2 correspondiente ( $\Delta ars2$ ,  $\Delta phoN2$ ,  $\Delta R2$  y  $\Delta H2$ ). La única diferencia estribó en la utilización de cada una de las cepas receptoras en las conjugaciones triparentales, correspondiente a los mutantes simples ( $\Delta ars1$ ,  $\Delta phoN1$ ,  $\Delta R1$  y  $\Delta H1$ ) en lugar de TEC1.

**6.5.4. Construcción de los plásmidos pVCI1, pVCI2, pVPPT1, pVPPT2, pVR1, pVR2, pVH1, pVH2.** Estos plásmidos se utilizan para complementar todas las deleciones realizadas en las cepas utilizadas en este trabajo. En todos los casos se siguieron los mismos pasos principales que se detallan a continuación: **Paso 1:** amplificación de la región de interés por PCR con los oligos adecuados (Tabla 7). El fragmento resultante fue digerido como *EcoRI/HindIII*. **Paso 2:** Ligación de este fragmento en los sitios compatibles del vector pVLT33 ( $Km^r$  y con origen de replicación RSF1010, de amplio espectro de hospedador) digerido con las mismas enzimas de restricción.

En la totalidad de los vectores resultantes derivados del pVLT33, se incluye la RBS propia de todos los genes clonados. Además, en los casos de pGCI1, pVCI1 y pVR1 los productos amplificados por PCR incluyen el hipotético promotor *Pars1*. Del mismo modo, pGCI2, pVCI2 y pVR2 incluirían a *Pars2*.

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los distintos plásmidos que complementan las deleciones indicadas.**

	Oligos	Complementación
<b>pVCI1</b>	FWDArs1/RVSArs1	<i>arsRBCH 1</i>
<b>pVCI2</b>	FWDArs2/RVSArs2	<i>arsRBCH 2</i>
<b>pVPPT1</b>	FWDPPPT1/RVSPPT1	<i>phoN1</i>
<b>pVPPT2</b>	FWDPPPT2/RVSPPT2	<i>phoN2</i>
<b>pVR1</b>	FWDR1/RVSR1	<i>arsR1</i>
<b>pVR2</b>	FWDR2/RVSR2	<i>arsR2</i>
<b>pVH1</b>	FWDH1/RVSH1	<i>arsH1</i>
<b>pVH2</b>	FWDH2/RVSH2	<i>arsH2</i>

**6.5.5. Construcción del plásmido pUCP-ArsN.** Para la sobreexpresión del gen PP\_1930.5 (*arsN* de *P. putida* KT2440, descrito por primera vez en este trabajo) en la cepa de *E. coli* W3110, el plásmido pUCP-ArsN fue construido de la siguiente manera: **Paso 1:** se amplificó la región que incluye al gen *arsN* -incluyendo su propia RBS- con los oligos oFWDArsN y oRVSArsN. Posteriormente el fragmento amplificado se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. **Paso 2:** En esta ocasión, el vector utilizado para clonar este fragmento fue el pUCP24 ( $Gm^r$ , con origen de replicación de amplio espectro de hospedador Cole1/RO1600), digerido previamente con los mismos sitios de restricción.

## **7. Técnicas de manipulación de ARN**

### **7.1. Extracción de ARN**

Para la extracción de ARN se cultivaron 50 mL de las cepas TEC1 (control),  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$  en medio LB suplementado con uracilo. Cuando los cultivos llegaron a su fase exponencial ( $A_{600}$  de 0.45) fueron divididos en dos muestras para inducir una de ellas con As(V), a una concentración de 75 mM durante 15 min, y dejar la otra como control.

Se extrajo el ARN de cada una de las muestras siguiendo las indicaciones del *kit RNeasy* (Qiagen). A continuación, para comprobar su integridad, el ARN resultante se analizó en *Bioanalyzer 2100*.

## **7.2. Retrotranscripción seguida de reacción de PCR cuantitativa (RT-Q-PCR)**

El ADNc producto de la reacción de retrotranscripción (RT) se obtiene a partir de 1 µg de ARN, utilizando la transcriptasa reversa *iTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase* de *Bio-Rad* y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó 1 µl de esta reacción (ADNc) como molde para la PCR cuantitativa posterior (termociclador *iCycler*). Los oligos que fueron utilizados para monitorizar las cantidades de transcrito de los operones *ars* en condiciones +/- As fueron: oFWDArsB1 y oRVSARSB1 para el operón *ars1*; oFWDArsB2 y oRVSARSB2 para el operón *ars2*; y, oFWDRpON y oRVSRpON para el control endógeno de la reacción. Dicho control endógeno pertenece a una región del gen *rpoN*, cuya transcripción no se encuentra afectada por la presencia/ausencia del tóxico añadido. En cada una de las reacciones de PCR se incluye un control de la reacción de RT en la que no se empleó la transcriptasa reversa, y donde no se obtuvo ninguna banda de amplificación, indicando que las preparaciones de ARN no contenían cantidades significativas de ADN contaminante.

## **8. Técnicas de manipulación de proteínas**

### **8.1. Obtención de extractos proteicos para purificación de pMALR1 y pMALR2**

El plásmido pMal-C2T (regalo de B. Calles) se construyó por mutagénesis dirigida del plásmido pMal-C2X (*New England Biolabs*). Las mutaciones, introducidas en dos fases consecutivas, dieron como resultado final la sustitución del sitio de reconocimiento del factor Xa, localizado entre la región codificante de la MBP (*Maltose Binding Protein*) y los sitios de clonación del plásmido, por un sitio de corte de la proteasa trombina. Para la obtención de los extractos crudos de *E. coli* (expresando las distintas proteínas reguladoras ArsR1 y ArsR2 de *P. putida* en pMAL-C2T) se cultivaron las células DH5α (pMALR1) y DH5α (pMALR2) durante toda la noche, sin agitación en medio LB y con Ap como antibiótico. . Al día siguiente, se utilizaron dichos cultivos para re-inocular 1 L de cultivo líquido, con el medio LB y la Ap al 50 %, suplementado con glucosa a

concentración final de 0.2 % y con agitación constante (170 rpm). Cuando el cultivo alcanzó una  $A_{600}$  de 0.5 se añadió IPTG a una concentración de 1 mM que se mantuvo durante 2 h. Los cultivos se concentraron 20 veces en un volumen de 40 ml de tampón Tris HCl 20 mM, pH 7.5, 100 mM NaCl. A continuación se lisaron empleando la prensa de *French* (FA-073 de *SLM Aminco*) operada a una presión de 1000 psi (del inglés *Pounds per Square Inch*, cuyo valor equivale a 1 libra por pulgada cuadrada). Las células rotas se centrifugaron a 4°C en un rotor SS34 (*Sorvall*) a 14000 rpm durante 15 min, recogiendo el sobrenadante (extracto crudo).

### 8.2. Purificación de las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2

El extracto (obtenido en el punto 8.1) se hizo pasar a través de una columna de 10 ml de Amilosa (Cat #E8021S de *New England Biolabs*) equilibrada en el tampón descrito previamente. La columna fue conectada a una bomba peristáltica y lavada con el *buffer* anterior, empleando un flujo de 1 ml / min. A continuación las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2 fueron eluidas de la columna utilizando una solución de maltosa al 10 % (por la que la proteína MBP tiene gran afinidad). Las fracciones recogidas se concentraron utilizando centricones *Amicon Ultra-4* de *Millipore* (Cat.# UFC801024) quedando a una concentración final de 1 mg/ml.

### 8.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en condiciones tanto desnaturizantes como no desnaturizantes. En condiciones desnaturizantes, se utilizó dodecilsulfato sódico (SDS), en geles de poliacrilamida (PAGE), a una concentración del 12.5 % según la técnica descrita previamente (Laemmli, 1970). Se hirvieron las muestras durante 10 min en presencia del tampón de ruptura (Tris HCl 250 mM a pH 6.8; SDS 2 %;  $\beta$ -mercaptoetanol 5 %; glicerol 10 % y azul de bromofenol 0.05 %). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente con el equipo *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (*Bio-Rad*) empleando un electrolito de composición: Tris HCl 25 mM pH 8.0, glicina 192 mM y SDS 0.1 %. Para la visualización de las proteínas, éstas fueron teñidas con *Coomassie Brilliant Blue R250*, según se describe previamente Swank y Munkres (1971).

Los geles no desnaturalizantes utilizados fueron preparados de la misma manera que los desnaturalizantes, con la salvedad de no utilizar SDS en los geles, el tampón de rotura y el tampón de corrida. Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular fueron proporcionadas por *Bio-Rad* (marcadores *Broad-Range*).

#### **8.4. Ensayos enzimáticos de ArsH's**

**8.4.1. Obtención de los extractos celulares.** Las muestras utilizadas en los ensayos enzimáticos fueron preparadas a partir de 50 ml de cultivo de las cepas de *P. putida* TEC1,  $\Delta$ H1 y  $\Delta$ H2 en medio LB suplementado con uracilo y 1 mM de As(III). Los cultivos en fase estacionaria fueron centrifugados a 4°C; 4000 rpm durante 10 min, y los sedimentos fueron posteriormente resuspendidos en solución de tampón fosfato (PBS). De este modo, 50 ml de cultivo celular con una  $A_{600}$  0.8 se resuspendieron en 2 ml de PBS. Posteriormente, las células fueron lisadas por sonicación en frío (5 pulsos de 30 segundos a máxima intensidad) y centrifugadas durante 30 min a 14000 rpm para sedimentar los residuos celulares. El sobrenadante fue utilizado en los respectivos ensayos enzimáticos, previa determinación del contenido de proteína por el método de Bradford (1976).

**8.4.2. Ensayos de la actividad oxidoreductasa de las proteínas ArsH1 y ArsH2 de *P. putida* KT2440.** Los ensayos de la actividad NAD(P)H:flavin oxidoreductasa fueron realizados como se describe en Vorontsov *et al.*, (2007), siguiendo el descenso en la absorbancia a 340 nm ( $\epsilon=6.22$  M/cm) a una temperatura de 25°C, durante 10 min en placas de 96 pocillos. Como equipo de detección se utilizó un espectrofotómetro Victor2 (*Perkin Elmer*). La actividad enzimática es expresada en nmoles de sustrato consumidos por mg de proteína y por min (mU/mg proteína). Los ensayos enzimáticos fueron realizados en volúmenes de 200  $\mu$ l con una mezcla de reacción consistente en: 150  $\mu$ M NADH ó NADPH, 100  $\mu$ M FMN ó FAD, 25 mM Tris-HCl (pH=7.5) y 75  $\mu$ g de proteína total (de las cepas silvestre y mutantes para ArsH).

### 8.5. Determinación *in vitro* de PPT y *N*-acetil-PPT

Los extractos celulares para la determinación de PPT y *N*-acetil PPT fueron preparados en matraces de 500 ml con 50 ml de medio mínimo M9, citrato 0.2 % + Km e IPTG 1 mM. Se crecieron cultivos de  $\Delta phoN1$  (pVLT33) y  $\Delta phoN1$  (pVPPT1) hasta una  $A_{600} = 1$  que fueron entonces centrifugados a 4000 rpm y 4°C; durante 10 min. Los sedimentos fueron posteriormente resuspendidos en una solución de tampón fosfato de tal forma que 50 ml de cultivo celular con una  $A_{600} = 0.8$  se concentraron en 2 mL de PBS. Las células fueron lisadas por sonicación en frío (5 pulsos de 30 segundos a máxima intensidad) y centrifugadas durante 30 min a 14000 x g para recoger los residuos celulares. El sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de proteína por el método de Bradford y la reacción enzimática de PPT a *N*-acetil PPT. Para el ensayo se prepararon mezclas de 200  $\mu$ L con 50  $\mu$ M de PPT y 50  $\mu$ M de acetil CoA. La reacción enzimática se inicia al añadir 200  $\mu$ g de extracto de proteína total y se detiene después de 5 min utilizando nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis por HPLC-MS.

### 8.6. Ultracentrifugación analítica

Los análisis mediante velocidad y equilibrio de sedimentación de las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2 fueron realizados en el laboratorio del Dr. Germán Rivas, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Los ensayos se llevaron a cabo a 20°C en una ultracentrífuga analítica modelo *Optima XL-I* (Beckman) equipada con un sistema adicional de detección mediante interferencia que permite el estudio de macromoléculas en disoluciones con alta absorción en el UV-VIS. Las proteínas de fusión purificadas fueron preparadas a una concentración de 1 mg/ml en un tampón Tris HCl 20 mM, pH 7.5, 100 mM NaCl. Para ver si se afectaba a la conformación nativa de alguna de las proteínas cada muestra se preparó por duplicado para añadir a uno de ellos As(III) a concentración 1 mM y con incubación a 4°C durante una noche. El ensayo de velocidad de sedimentación se realizó a 43000 rpm. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck, 2000). Posteriormente un volumen menor (80  $\mu$ l) de las soluciones de MBP-R1 y MBP-R2 fueron centrifugadas para determinar el equilibrio de sedimentación por la técnica de

*overspeeding* -rápidamente para evitar posibles degradaciones de la proteína y poder controlar directamente los datos- (Chatelier, 1988). Las masas moleculares aparentes de las proteínas de fusión fueron determinadas mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación que describe la distribución de concentraciones radiales de un soluto ideal en un equilibrio de sedimentación con el programa EQASSOC (Minton, 1994). Los volúmenes específicos parciales fueron calculados a partir de la secuencia de aminoácidos, usando el programa de acceso público SEDNTERP (Laue, 1992) <http://www.iphilo.mailway.com/download.htm>.

### 9. Determinación de Arsénico total intracelular

Estas medidas se llevaron a cabo en las cepas TEC1,  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$  de *P. putida* KT2440. Para ello, se siguió el siguiente protocolo. **Paso 1:** Inoculación de cultivos líquidos (20 ml) de las cepas de interés en LB, suplementado con uracilo, y con una concentración final de As(V) de 100 mM. **Paso 2:** Centrifugación de los cultivos a 4°C y 4000 rpm en tubos *Falcon* de 50 ml durante 10 min. **Paso 3:** Eliminación del sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1 ml de H<sub>2</sub>O *MilliQ* y se trasvasó a tubos *eppendorf* de 2 ml previamente secados (100°C por 24 h) y pesados (balanza de 5 decimales). **Paso 4:** Se secó la biomasa durante 24 h a 100°C y se estimó el peso seco de la misma. Se hicieron duplicados biológicos para todas las muestras.

Las muestras fueron, en ese punto, enviadas al Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) donde se les sometió a una digestión ácida con ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>). Por último para la cuantificación del As total las muestras se analizaron por Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), mediante un equipo ICP-MS *Elan 6000 Perkin-Elmer Sciex* equipado con *autosampler* AS 91.

### 10. Análisis de los datos de secuencia

Los análisis de secuencias de nucleótidos se realizaron con los programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) y *ApE-A Plasmid Editor* v1.12 (Copyright© 2003-2005, M. Wayne Davis). Las búsquedas de marcos abiertos de lectura (ORF) se realizaron con el programa *ORF FINDER* del servidor NCBI



(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Las secuencias de aminoácidos de los distintos ORF se compararon con las presentes en las bases de datos de genomas secuenciados o en vías de secuenciación empleando el algoritmo TBASTN (Altschul *et al.*, 1990) del servidor NCBI ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)). Las búsquedas de similitudes de secuencia se realizaron utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) en el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Los alineamientos de secuencias de nucleótidos y los alineamientos múltiples de proteínas se realizaron con los programas *ALIGN* (Wilbur y Lipman, 1983) y *CLUSTALW* (Thompson *et al.*, 1994), respectivamente, en el editor *BioEdit*. Las masas moleculares de las proteínas se calcularon con el programa Compute pI/Mw del servidor *Expasy* ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)), mientras que la búsqueda de dominios conservados y motivos se llevó a cabo con el programa *SMART* (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2009) <http://smart.embl-heidelberg.de/>. Como visualizador molecular y modelado de proteínas se utilizó el programa *PyMOL* (Copyright © 2009 DeLano Scientific LLC; <http://www.pymol.org/funding.html>) y para la comparación de estructuras de proteínas *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004) <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>. En los casos en los que se modelaron proteínas, se utilizaron como referencia configuraciones tridimensionales con homología de la base de datos *SwissModel* (Arnold *et al.*, 2006). Para los acoplamientos (*dockings*) moleculares se empleó el programa *PatchDock* (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005). Las predicciones de promotores hipotéticos se realizaron con el programa *BPRom* del paquete *SoftBerry* (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) y la formación de estructuras secundarias con *RNAfold* (Mathews *et al.*, 1999).



## **IV. RESULTADOS**



## Capítulo I.

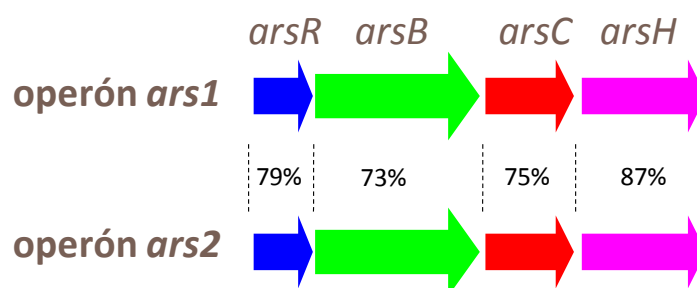
**Caracterización de los operones *ars* de *P. putida* KT2440 y su funcionalidad.**

**Procedencia del operón *ars1*. *Ecoparalogía* entre los operones *ars1* y *ars2***



### 1. Configuración de los operones *ars1* y *ars2* en *P. putida* KT2440

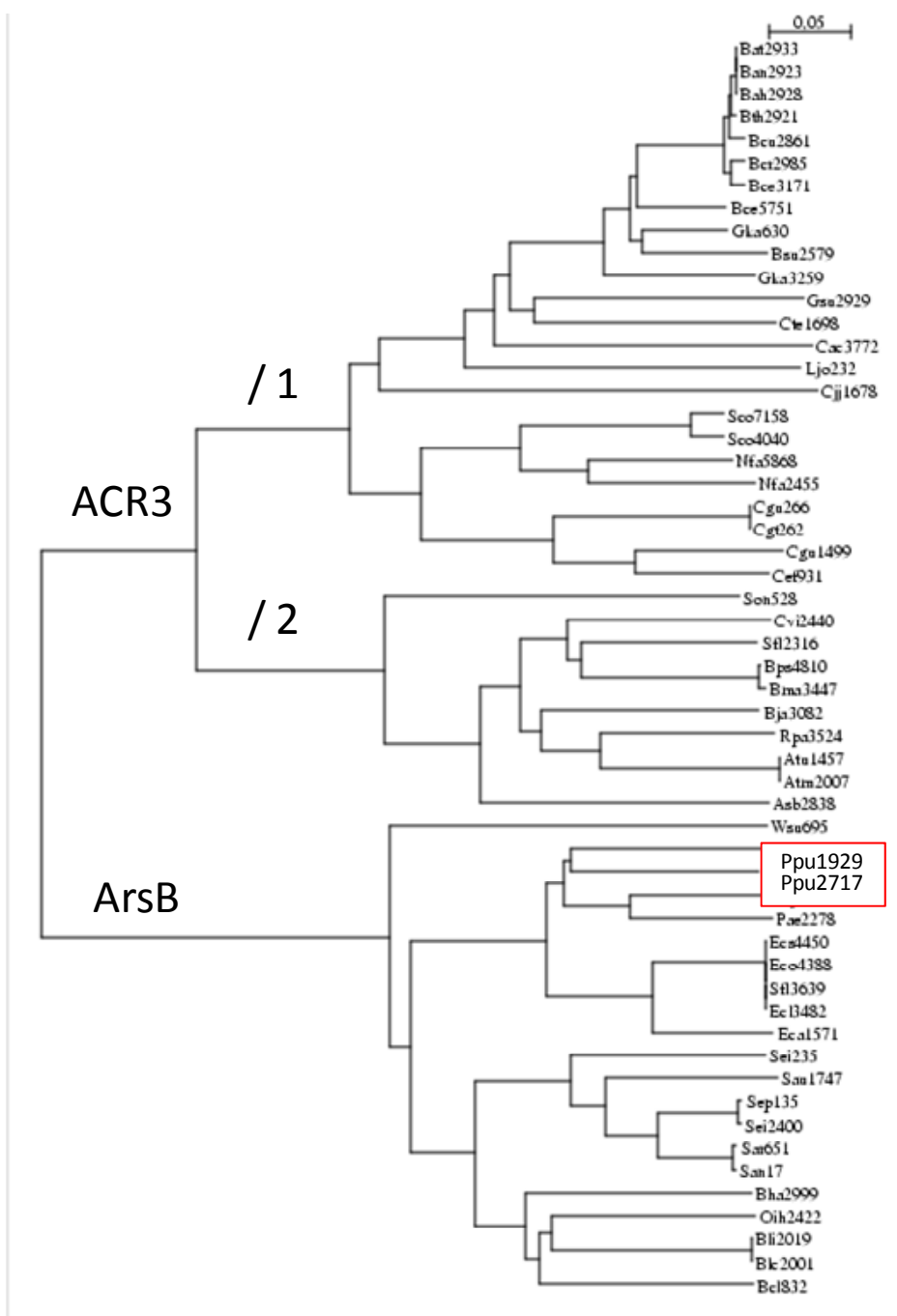
Los 2 operones *ars* de *P. putida* KT2440 (**Fig. 8**) se encuentran constituidos por un regulador transcripcional (*arsR*), un transportador secundario encargado de expulsar As(III) y Sb(III) al exterior de la célula (*ArsB*), una arsenato reductasa cuya misión es transformar arsenato en arsenito (*ArsC*) y un gen *arsH* de función desconocida hasta ahora en su papel frente al arsénico (Canovas *et al.*, 2003). En los Capítulos III y IV del apartado de Resultados se detalla la funcionalidad de las proteínas ArsH y los mecanismos de regulación de los operones *ars* de *P. putida* KT2440, respectivamente.



**Fig. 8.** Identidad de secuencias entre los 2 operones de resistencia a arsénico de *P. putida* KT2440

#### 1.1. Las proteínas de expulsión de As(III) y Sb(III) en *P. putida* KT2440 pertenecen a la familia ArsB

Como ya se describió previamente, existe diversidad entre los transportadores de arsenito en las bacterias con el operón *ars*. En el caso de *P. putida* KT2440, el tipo de bomba de expulsión del tóxico pertenece al grupo de las proteínas ArsB como demuestra el árbol filogenético de la **Fig. 9**. Se pueden identificar las familias de los distintos transportadores como: **1)** tipo ArsB (más frecuente en  $\gamma$ -Proteobacteria y Firmicutes) ó **2)** tipo ACR3 (con mayor representatividad en Actinobacteria y  $\alpha$ -Proteobacteria). Se seleccionaron distintas bacterias características de cada uno de los grupos indicados para verificar dicho resultado. El árbol filogenético fue construido con las secuencias del gen identificado como bomba de expulsión de As(III) en cada caso utilizando alineamientos *Clustalw*.



**Fig. 9. Filogenia de los distintos transportadores de As(III) / Sb(III) en bacterias.**

Para poder estudiar la distribución de las distintas proteínas de expulsión de arsenito se seleccionaron diferentes grupos representativos. Se observa cómo en el grupo **ACR3 / 1** predominan bacterias del género *Bacillus* (Ban, *Bacillus anthracis*; Bce, *Bacillus cereus*; Bsu, *Bacillus subtilis*) y Actinobacterias (Cgu, *Corynebacterium glutamicum*). Para el caso de **ACR3 / 2** existe presencia fundamentalmente de  $\alpha$ -Proteobacterias (Rpa, *Rhodopseudomonas palustris*; Atu, *Agrobacterium tumefaciens*). Entre los representantes del grupo **ArsB** se encuentran fundamentalmente  $\gamma$ -Proteobacterias (Eco, *Escherichia coli*; Pae, *Pseudomonas aeruginosa*). En el recuadro rojo se representan los dos genes *arsB* de *P. putida* (Ppu).



## 1.2. Las arsenato reductasas de *P. putida* KT2440 (ArsC) dependen del acoplamiento con Tiorredoxina

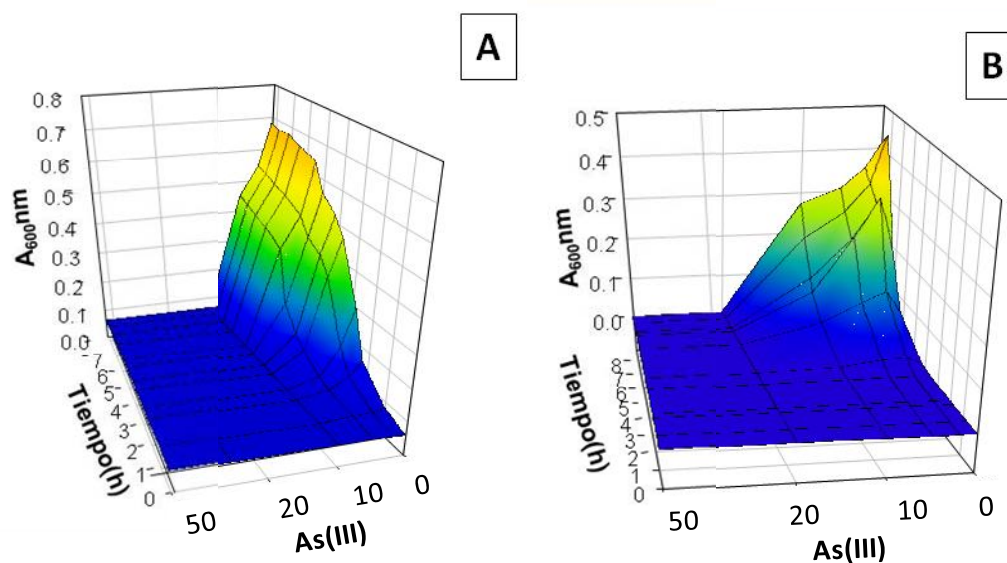
Las proteínas ArsC de *P. putida* KT2440 (ArsC1, PP\_1928 y ArsC2, PP\_2716) fueron alineadas con la arsenato reductasa de *Bacillus subtilis*, como referencia de aquellos dependientes de tiorredoxina. Se encontraron perfectamente conservados los 3 residuos de cisteína encargados de la correspondiente reacción bioquímica (**Fig. 10**). El mismo alineamiento fue realizado utilizando como modelo a ArsC de *E. coli* (dependiente de glutarredoxina) sin encontrar identidad alguna en el centro activo (datos no mostrados).

Ppu1928	MNRRYLMKVL	FMCTHNSCRS	ILSEALFNHL	APEGMEAVSS	GSFPSPGKVNE
Ppu2716	.....MRVL	FMCTANSRCS	ILSEAMFNHL	APPGFEAVSA	GSFPKGQVLP
Bsu2578	...MENKIIY	FLCTGNSCRS	QMAEGWAKQY	LGDEWKVYSA	GIEAHG.LNP
Ppu1928	RALKTLEAAG	IPTAGLSSKA	SDAFESSPPD	IVVTVCDRAA	GEACPIFFGP
Ppu2716	RSLSTLQQAN	ISTEGLSSKG	NDAFEGNPPD	IVITVCDKAA	GEACPVYFGP
Bsu2578	NAVKAMKEVG	IDISNQTSDI	IDSILNNAD	LVVTLCGDAA	.DKCPMTPPH
Ppu1928	SLKAHWGLAD	PSAVTGSETE	IEEAFQTTLA	KIDERVRAFI	ALPFSQLSQD
Ppu2716	ALKSHWGLED	PSDVVGDEAT	VDAAFRATLA	RIESRCQAFF	ALPFDHLDRE
Bsu2578	VKREHWGFDD	PARAQGTTEE	KWAFFQVRD	EIGNRLKEFA	ETGK.....
Ppu1928	ELKAEFARIG	AL			
Ppu2716	QLKHALDRIG	SL			
Bsu2578	.....	..			

**Fig. 10. Alineamientos de ArsC.** Ppu1928 y Ppu2716 corresponden a ArsC1 y ArsC2 *P. putida* KT2440, respectivamente. ArsC de *B. subtilis* (Bsu2568) fue usada como proteína modelo dependiente de tiorredoxina en los alineamientos. Se observa una perfecta conservación del centro activo (residuos en amarillo) y una identidad muy alta entre ellas.

## 2. La resistencia a As en *P. putida* KT2440 se induce por As(III)

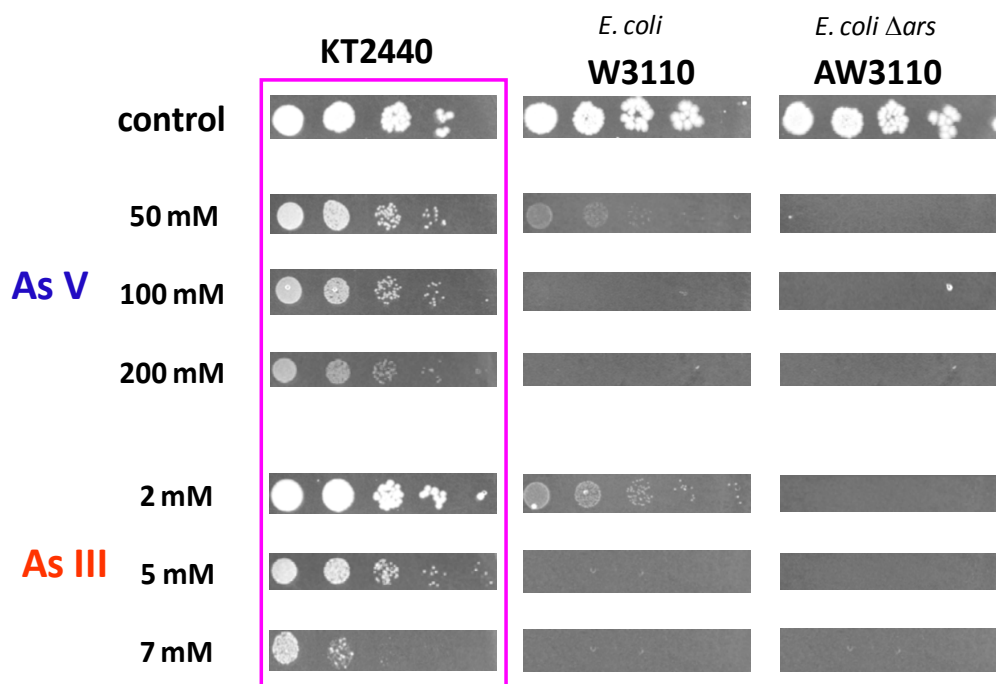
Los estudios descritos previamente en la literatura indican que los operones *ars* se inducen por arsenito y antimonito (Shi *et al.*, 1996). Se estudió la inducibilidad de los sistemas de resistencia a arsénico de *P. putida* KT2440 utilizando especies de As(V) y As(III) como efectores. Así, se utilizaron para crecer a la cepa en medio LB y distintas concentraciones de As(III) preinóculos precrecidos en LB, LB+As(V), y LB+As(III). El resultado fue una mayor resistencia a arsénico únicamente cuando el medio de cultivo del preinóculo era LB+As(III), pudiendo así determinar la inducibilidad del sistema en *P. putida* KT2440 por esta especie química (**Fig. 11**).



**Fig. 11. Crecimiento de *P. putida* KT2440 frente a As(III) a distintos tiempos.** Se muestran los niveles de crecimiento de *P. putida* KT2440 expresados como valores de  $A_{600}$  en relación al tiempo y frente a diferentes concentraciones de As(III). Los ensayos se realizaron en cultivo líquido a partir de **(A)** un preinóculo no preinducido o **(B)** preinducido con As(III) 5 mM durante 12 h. Se observan las diferencias en las concentraciones entre 5-20 mM As(III). Los ensayos realizados con preinóculos inducidos con 100 mM As(V) presentaban el mismo patrón que el panel A.

### 3. *P. putida* KT2440 es hiperresistente al arsénico

Para comprobar la resistencia a las distintas formas de As(V) y As(III) por parte de *P. putida* KT2440, se realizaron distintos ensayos en placa y en cultivo líquido. El medio seleccionado en ambos casos fue un medio rico (LB), al que se le añadieron distintas concentraciones de los tóxicos indicados. Una referencia interesante para contrastar los resultados obtenidos para *P. putida* KT2440, fue utilizar como controles las cepas *E. coli* W3110 y *E. coli* AW3110 (mutante en el operón *arsRBC*, ver Tabla 2) (**Fig. 12**). Se pudo así determinar la resistencia de la cepa de estudio frente a ambas especies químicas de arsénico, siendo de: 300 mM frente a As(V) y 10 mM frente a As(III) tras 24 h de incubación. Ello convierte a *P. putida* KT2440 en una de las especies bacterianas más resistentes a arsénico descritas hasta la fecha.



**Fig. 12. Ensayo en placa de resistencia frente a As(V) y As(III).** Se puede comprobar la tolerancia a As(V) y As(III) de las cepas *P. putida* KT2440, *E. coli* W3110 y *E. coli* AW3110 a las concentraciones indicadas. Las gotas mostradas tenían un volumen de 8  $\mu$ l y representan distintas diluciones seriadas (de izquierda a derecha:  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  células/ml). Los controles se realizaron sobre placas de LB agar. En rosa se resalta la hipertolerancia de *P. putida* KT2440. Fotos tomadas tras 22 h de incubación.

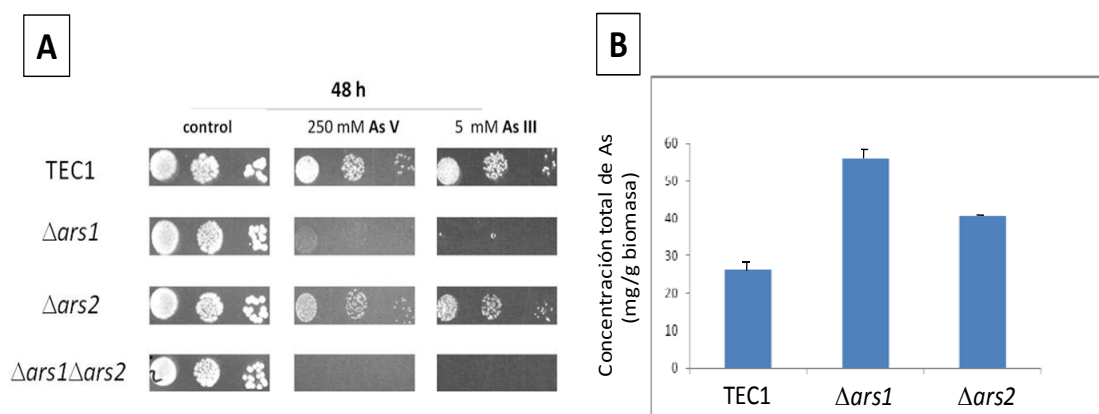
### 3.1. Fenotipo de los mutantes $\Delta$ ars1, $\Delta$ ars2 y $\Delta$ ars1 $\Delta$ ars2: Resistencia y acumulación de arsénico. Solapamiento funcional de los operones *ars*

La construcción de los distintos mutantes utilizados en este punto, así como los plásmidos necesarios para sus complementaciones se encuentran detallados en los puntos 6.5.1, 6.5.3 y 6.5.4 del apartado Materiales y Métodos, respectivamente (ver construcciones en punto 3.1 y 4.3 del ANEXO I).

Los estudios de resistencia y acumulación de arsénico se realizaron en la cepa *P. putida* TEC1 y sus derivados. Esta cepa se utilizó como control, en lugar de *P. putida* KT2440, al ser el fondo genético donde se desarrollaron los mutantes. Las cepas  $\Delta$ ars1,  $\Delta$ ars2 y  $\Delta$ ars1 $\Delta$ ars2, fueron entonces evaluadas para estudiar la participación de los operones *ars1* y *ars2* de la bacteria en la resistencia al metaloide (**Fig. 13**). Estos ensayos se realizaron tanto en medio sólido como en cultivo líquido a múltiples concentraciones

de As(V) y As(III). Se pudo así determinar la resistencia de los distintos mutantes a las diferentes concentraciones de las especies químicas de arsénico estudiadas. Para los experimentos en medio líquido, las condiciones de cultivo fueron siempre las mismas: medio LB, suplementado con uracilo, a 30°C con 24 h de incubación (**Tabla 8**). De los resultados obtenidos se deduce que: **1)** los dos operones *ars* de *P. putida* KT2440 son funcionales, ya que ambos fueron capaces de otorgar una elevada resistencia a las dos especies químicas de arsénico, **2)** el operón *ars1* confirió mayor tolerancia a los tóxicos que *ars2*, en las condiciones estudiadas. Se observó que el mutante  $\Delta ars1$  es más sensible especialmente frente a As(III) y presenta mayores niveles de acumulación intracelular, y **3)** cuando se eliminaron ambos operones ( $\Delta ars1\Delta ars2$ ) la cepa se volvió hipersensible. Esta hipersensibilidad del doble mutante descarta el papel de otros genes anotados como *arsC* en el genoma de *P. putida* KT2440 como posibles mecanismos de resistencia.

Por último, se realizaron todas las complementaciones correspondientes y se observó la recuperación de los fenotipos silvestres (punto 5 del ANEXO I).



**Fig. 13. Resistencia y acumulación de As en *P. putida* TEC1 y sus cepas derivadas, mutantes en los operones *ars*.** (A) Crecimiento en placa de TEC1,  $\Delta ars1$ ,  $\Delta ars2$  y  $\Delta ars1\Delta ars2$  en medio rico. Se muestran el resultado tras 48 h de incubación y en diluciones seriadas (8  $\mu$ l de  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  células/ml) para cada uno de ellos. (B) Acumulación de As total intracelular en los mutantes simples  $\Delta ars1$ ,  $\Delta ars2$  respecto al control TEC1 (detalles del ensayo en el punto 9 del apartado de Materiales y Métodos).

Tabla 8. Valores de resistencia a arsénico en los distintos mutantes de *P. putida* TEC1.

	As(V) mM	As(III) mM
TEC1	300 <sup>a)</sup>	10
$\Delta ars1$	200	3
$\Delta ars2$	250	7
$\Delta ars1\Delta ars2$	2	0.2

<sup>a)</sup> Todos los valores que se indican en la Tabla corresponden a la concentración a la cual el organismo no es capaz de crecer o Dosis Letal.

#### 4. Los operones *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 confieren resistencia en *E. coli*

Los grupos de genes *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 fueron expresados de manera heteróloga en *E. coli*. Para ello se utilizaron los vectores pGCI1 y pGCI2, respectivamente (Tabla 3; construcciones en 4.2 del ANEXO I). Se empleó a *E. coli* DH5 $\alpha$  como hospedador en los ensayos y se pudo observar que ambos sistemas otorgan mayor resistencia tanto frente a As(V) como a As(III), siendo de nuevo el operón *ars1* de *P. putida* KT2440 el más eficiente en las condiciones utilizadas.

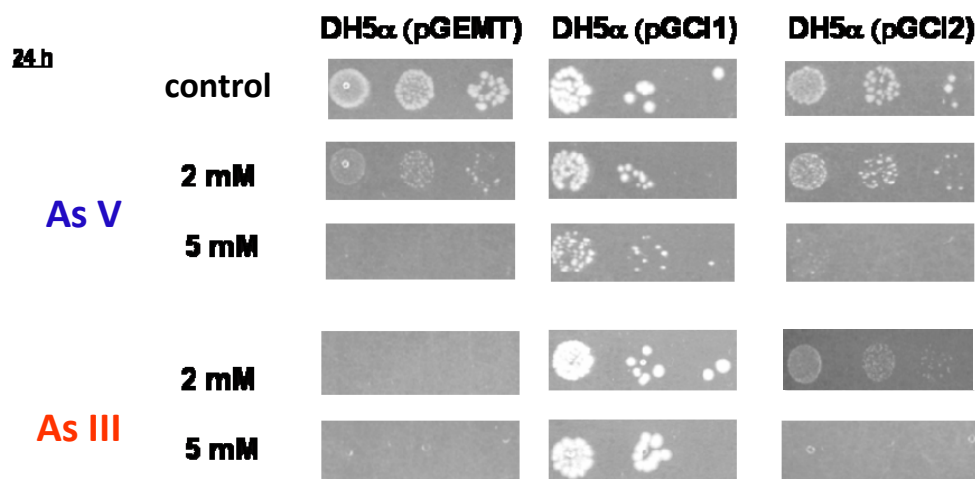


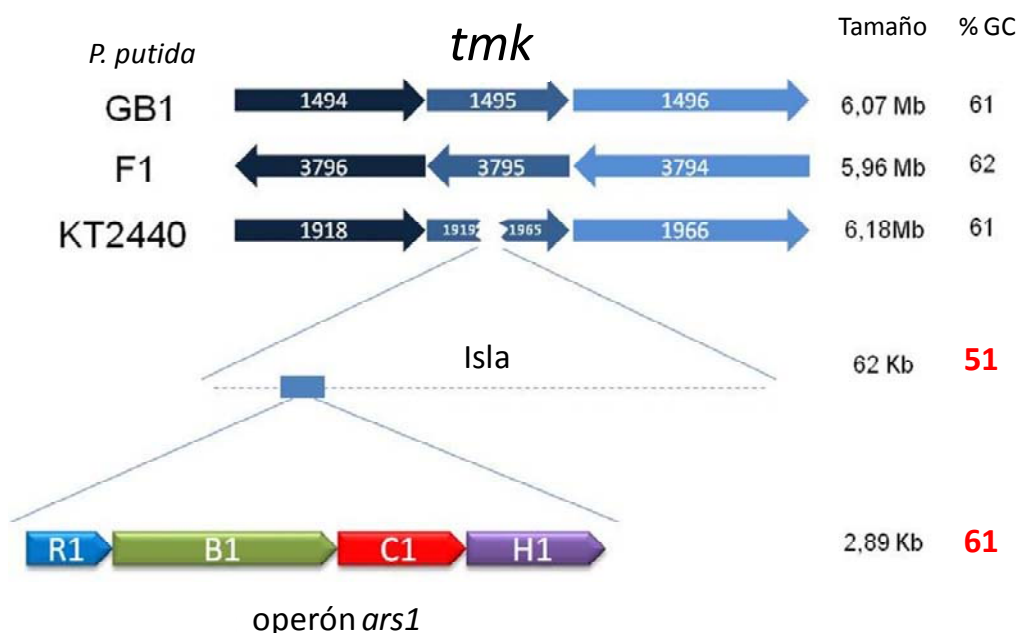
Fig. 14. Resistencia a As(V) y As(III) de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  complementada con los operones *ars* de *P. putida* KT2440. Se muestra el resultado del crecimiento en placa tras 48 h de incubación y en diluciones seriadas (8  $\mu$ l de  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  células/ml) para cada uno de ellos. pGEMT representa el vector vacío mientras que pGCI1 y pGCI2 expresan los operones *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440, respectivamente. Las condiciones control se hicieron en medio LB con Ap.

## 5. Ecoparalogía entre *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440

### 5.1. El operón *ars1* de *P. putida* KT2440 se adquirió debido a un evento de transferencia horizontal (TH)

Utilizando la secuencia del genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002) se pudo determinar la localización del operón *ars1* (genes de PP\_1927 a PP\_1930) dentro de una isla genómica de 62 kb. Comparando la secuencia de *P. putida* KT2440 con la de otras cepas de *P. putida* descritas a día de hoy (F1, GB1 y W619) se observó que el gen timidilato kinasa (*tmk*) se encontraba interrumpido en su extremo *N*-terminal (PP\_1919) y *C*-terminal (PP\_1965) por una región con características atípicas (en % GC e IAC) en el caso de *P. putida* KT2440. El mismo gen *tmk* permanecía perfectamente conservado en el resto de cepas (**Fig. 15**). TmK es un enzima ubicuo de unos 25 KDa importante en la ruta de síntesis de dTTP para generar ADN.

El contenido genético de la isla genómica se encuentra detallado en el punto 6 del ANEXO I.



**Fig. 15. Interrupción del gen *tmk* en *P. putida* KT2440.** Descripción del entorno donde se encuentra la isla genómica de 62 Kb en la que se localiza el operón *ars1*. Además se indican algunas características como tamaño y contenido medio de GC de las cepas indicadas, isla y operón *ars1*.

Se estudiaron las diferencias en el índice de adaptación de codones, IAC (Sharp y Li, 1987) y en el porcentaje de guaninas y citosinas (% GC) entre la media del genoma de *P. putida* KT2440 respecto de la isla genómica donde se localiza el operón *ars1* (Fig. 16). Se pudieron apreciar variaciones significativas en ambos casos, determinando esta región como atípica en el genoma de *P. putida* KT2440.

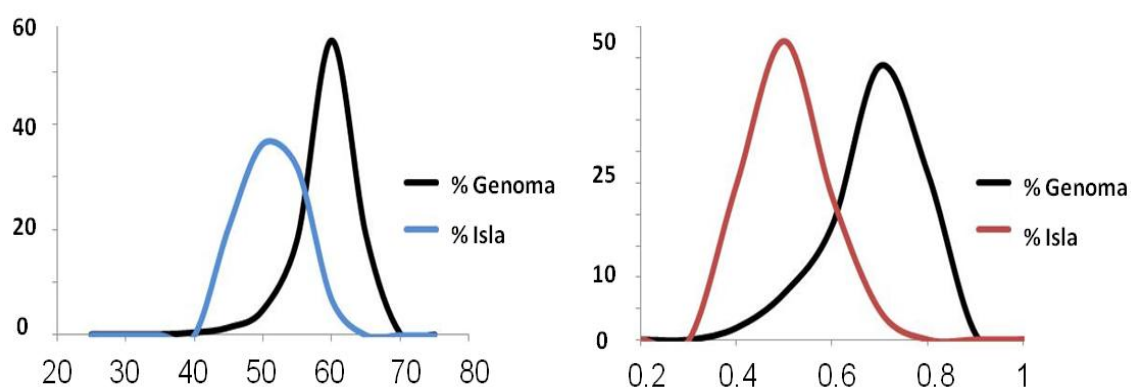
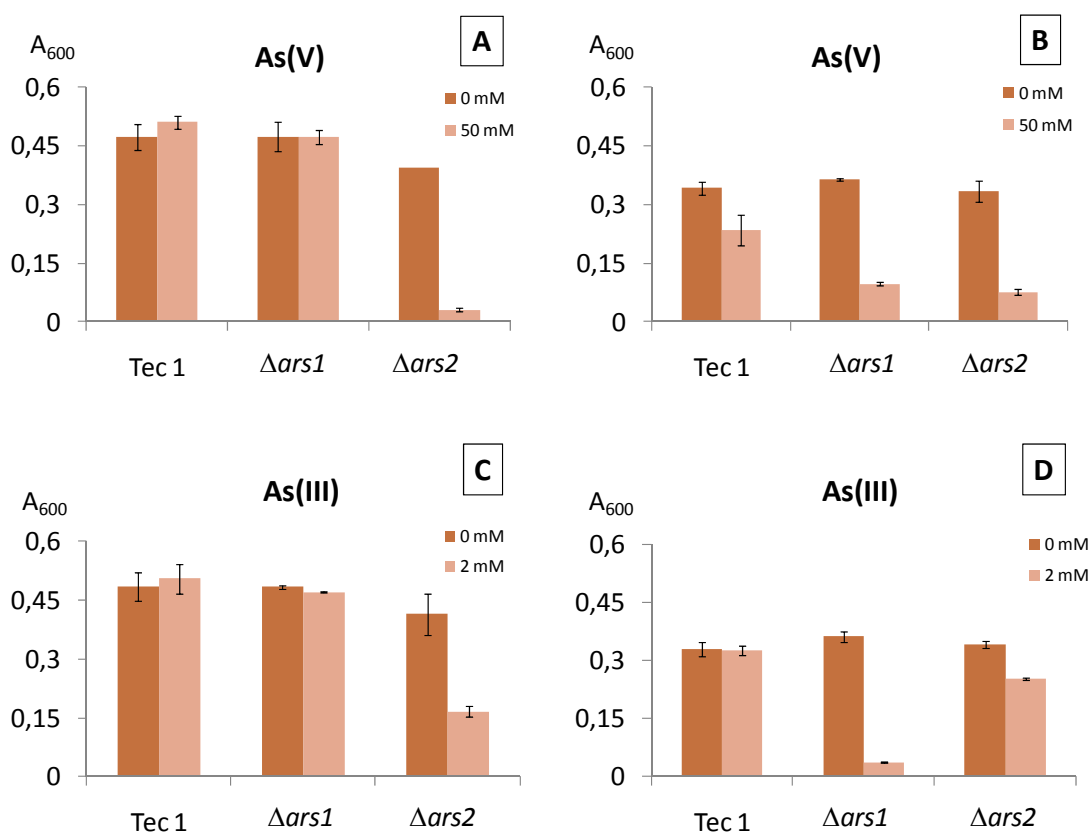


Fig. 16. Variaciones de (A) % GC y (B) IAC entre el genoma de KT2440 y la isla genómica donde se encuentra el operón *ars1* de *P. putida* KT2440.

## 5.2. *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 son *ecoparálogos*. Misma función y distinta eficiencia a diferentes temperaturas

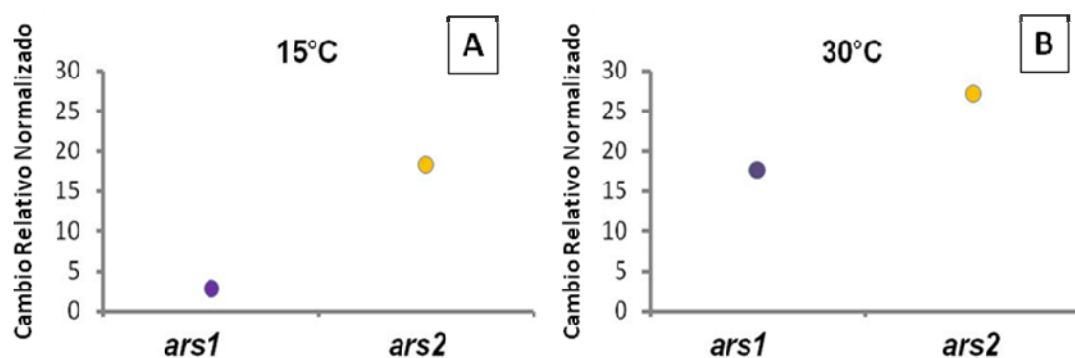
Con objeto de conocer por qué *P. putida* KT2440 mantiene los dos operones *ars* en su genoma se realizaron ensayos frente a arsénico de los mutantes simples  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$ , en diferentes condiciones ambientales. Por un lado, se utilizaron altas concentraciones de sal (hasta 500 mM de NaCl) como agente estresante de osmolaridad. No se observó ningún efecto de la osmolaridad provocada por esta adición sobre el comportamiento de las cepas de estudio respecto al control sin sal (punto 7 del ANEXO I). Sin embargo, cuando se utilizaron distintas temperaturas (15°C y 30°C) la eficiencia de los 2 sistemas de resistencia a arsénico cambió muy significativamente. Los ensayos frente a As(V) y a As(III) en TEC1,  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$  fueron realizados a las siguientes condiciones: 15°C, 30°C ( $T^a$  óptima de crecimiento) y 37°C. En la Fig. 17 se pudo observar cómo la eficiencia del operón *ars2* fue mucho mayor a baja  $T^a$  (15°C) que la del operón *ars1*, frente a los dos tóxicos, proporcionándole mayor resistencia. Sin embargo, la presencia de *ars1* tuvo más relevancia a 30 y 37°C, especialmente frente a As(III).



**Fig. 17. Resistencia a arsénico a 15°C y 30°C de *P. putida* TEC1,  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$ .** (A) y (B) muestran experimentos de resistencia frente a As(V) mientras que (C) y (D) lo hacen frente a As(III). En (A) y (C) la incubación de los cultivos fue de 48 h a una Tª de 15°C. En (B) y (D) los resultados se obtuvieron tras 8 h de incubación a 30°C. Ensayos realizados con triplicados biológicos. Los resultados a 37°C coinciden con los obtenidos a 30°C, por lo que no se representaron en el gráfico.

**5.2.1. Diferencias en la transcripción a diferentes temperaturas.** Los cambios en la resistencia a arsénico de los distintos mutantes estudiados, como consecuencia de variaciones en la Tª, podrían estar sujetos a diferencias en la transcripción de ambos sistemas. Para comprobar esto, se realizaron experimentos de RT-Q-PCR. Se evaluó así la cantidad de transcrito existente tras tratar a los organismos con arsenato 75 mM y normalizar con la expresión del gen *rpoN*, utilizado como control endógeno (detalles en el punto 7.2 del apartado Materiales y Métodos). Se pudo advertir que, tanto a 15°C como a 30°C, el operón endógeno de *P. putida* KT2440 (*ars2*) presenta mayores valores en la transcripción. Sin embargo, *ars1* parece estar significativamente reprimido a bajas temperaturas (15°C) (Fig. 18).





**Fig. 18. Expresión relativa de los operones *ars* de KT2440 a diferente T<sup>a</sup>.** Diferencias en la transcripción de *ars1* y *ars2* a (A) 15°C y (B) 30°C, respectivamente. Se utilizó el gen *rpoN* como control endógeno de la reacción. Se realizaron duplicados técnicos y biológicos en el experimento.



## **Capítulo II.**

**Genes accesorios al operón *ars* involucrados en la resistencia a As en**

***P. putida* KT2440**



En el presente Capítulo se describe la importancia de los genes *arsH1*, *arsH2* y *arsN* en la resistencia a arsénico de *P. putida* KT2440, más allá del núcleo central de los operones *ars*, constituidos por *arsRBC* y descritos en el Capítulo anterior.

## 1. Genes *arsH* de *P. putida* KT2440

### 1.1. Descripción de las proteínas ArsH de *P. putida* KT2440

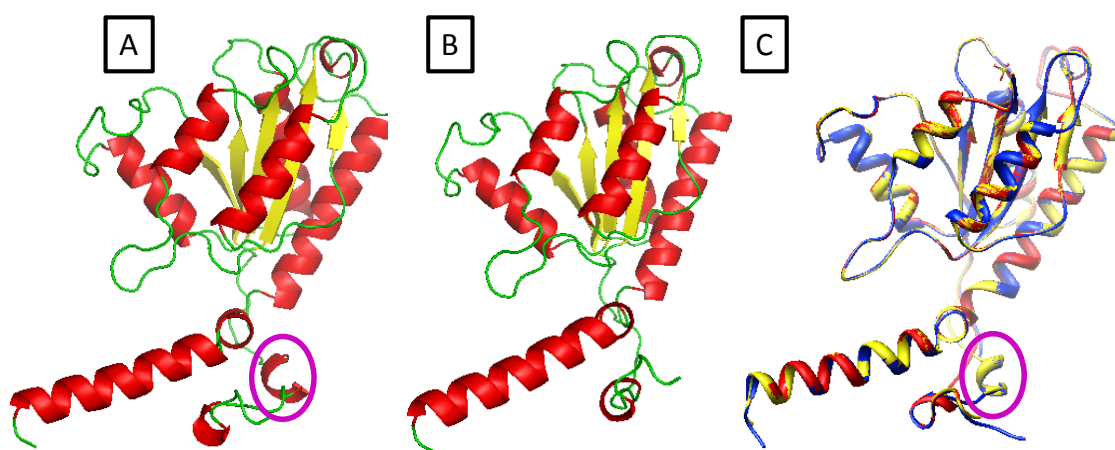
Los productos de los genes *arsH1* (PP\_1927) y *arsH2* (PP\_2715) de *P. putida* KT2440 se encuentran anotados en el genoma como proteínas implicadas en la resistencia a arsénico. Presentan un dominio conservado NADPH-reductasa dependiente de FMN (PF:03358). Sin embargo, nadie ha definido hasta ahora con claridad el papel que desempeñan estas reductasas y el proceso bioquímico en el que participan. Ambas proteínas son muy parecidas, teniendo un tamaño de 241 aminoácidos y un peso molecular de 27717 Da para ArsH1, y de 233 aminoácidos y 26616 Da para ArsH2. Utilizando alineamientos dobles entre secuencias de proteínas con la aplicación de *BLAST* (*bl2seq*), se pudo observar la alta identidad de aminoácidos entre ambas secuencias (**Fig. 19**).

Identidad = 193/237 (81%), Positivos = 211/237, Gaps = 4/237 (1%)					
ArsH1	5	MNDHLPNVQPELIDLPSLERLTPKHPSTHKPRILLLYGSTRERSFSRLMVQEAARLLEEF	64		
ArsH2	1	M++ LPN+ L DLP TP HKPRILLLYGSTRERSFSRL+V+EAARLLE F			
		MSEQLPNLDLTLFDLPP--SATPT--CEHKPRILLLYGSTRERSFSRLVVEEAARLLEHF	56		
ArsH1	65	GAETRIFDPSGLPLPDDAPDSHEKVLELRELMQWSEGQVWCSPERHGMSAVFKAQIDWV	124		
ArsH2	57	GAETR F D P S G L P L P D D P H K V E L R E L + Q W S E G Q V W C S P E R H G + M S A V F K A Q I D W +			
		GAETRIFDPSGLPLPDDVPVEHPKVQELRELQWSEGQVWCSPERHGAMS AVFKAQIDWI	116		
ArsH1	125	PLAIGAVRPTQGKTLAVMQVCGGSQSFNVVNQLRVLGRWMMFTIPNQSSVPKAFLEFDE	184		
ArsH2	117	PLA+GA+RPTQGKTLAVMQVCGGSQSFNVVNQLRVLGRWMMFTIPNQSSVPKA+LEFD+			
		PLALGALRPTQGKTLAVMQVCGGSQSFNVVNQLRVLGRWMMFTIPNQSSVPKAYLEFDD	176		
ArsH1	185	AGRMKPSSFYDRLVDVMEELTKFTLLLRDRQDYLVDRYSERKESAEELSKRVNIRSI	241		
ArsH2	177	AGRMKPS +YDR+VDVMEEL KFT+LLRDRQ +LVDRYSERKESAE+LS+RVN RSI			
		AGRMKPSPYDRVVDVMEELVKFTVLLRDRQAFVLDRYSERKESAEQLSERVNQRSI	233		

**Fig. 19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas ArsH de *P. putida* KT2440.**  
Se muestra el porcentaje de identidad de secuencia.

Para examinar la conservación de la estructura de ArsH1 y ArsH2 con respecto al cristal de la proteína ArsH de *Sinorhizobium meliloti*, resuelto recientemente (Ye *et al.*, 2007),

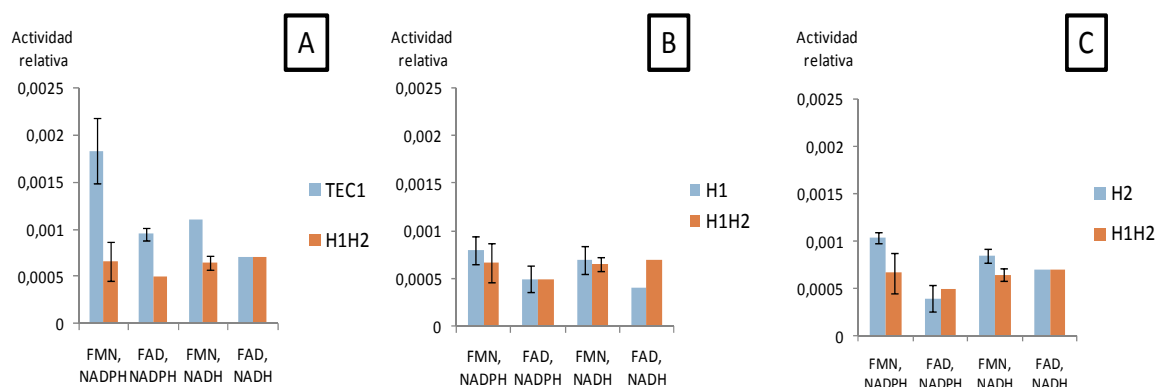
se realizó un procedimiento de *threading*, identificando una alta identidad de las 2 proteínas de *P. putida* KT2440 respecto a la configuración 3D publicada. En efecto, utilizando el modelado de proteínas con el programa PyMOL y la comparación de estructuras con *UCSF Chimera*, se encuentran las 5 láminas *beta* y las 7 hélices *alfa* perfectamente conservadas respecto del modelo. Únicamente existe una diferencia en una pequeña hélice *alfa* no existente en ArsH2 cerca del extremo *N*-terminal que no está descrita como relevante.



**Fig. 20. Representación de la estructura tridimensional de los monómeros ArsH de *P. putida* KT2440. (A) ArsH1; (B) ArsH2.** Tanto en A como en B se muestran las hélices, las láminas y los lazos en rojo, amarillo y verde, respectivamente. **(C)** Alineamiento de las estructuras de ArsH1 (en amarillo) y ArsH2 (en rojo) de *P. putida* KT2440 con ArsH de *S. meliloti* (en azul). Se muestra en el círculo morado el detalle del residuo de hélice no presente en ArsH2.

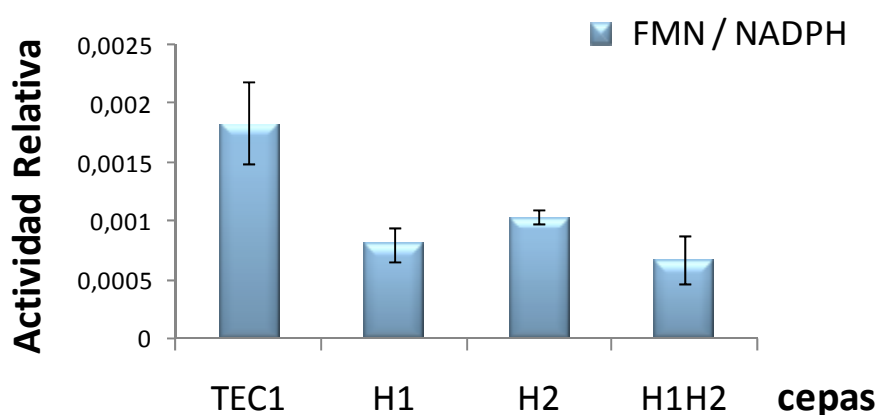
## 1.2. Las proteínas ArsH1 y ArsH2 de *P. putida* KT2440 muestran actividad NADPH oxidorreductasa dependiente de FMN

Para explorar la posible actividad asociada a las proteínas ArsH, se realizaron diferentes ensayos de actividad oxidorreductasa utilizando extractos bacterianos de la cepa silvestre *P. putida* TEC1, y de las cepas mutantes  $\Delta$ H1,  $\Delta$ H2 y  $\Delta$ H1 $\Delta$ H2 crecidas en un medio con 1 mM de arsenito (ver detalles en los puntos 8.4.1 y 8.4.2 del apartado Materiales y Métodos). Cuando se comparó la actividad del doble mutante, utilizado como fondo, respecto de las demás cepas, únicamente se observó actividad catalítica con NADPH como sustrato y FMN como cofactor. Otras combinaciones fueron realizadas utilizando también NADH y FAD (**Fig. 21**).



**Fig. 21. Ensayo de actividad oxidorreductasa en las cepas *P. putida* TEC1,  $\Delta$ H1,  $\Delta$ H2 y  $\Delta$ H1 $\Delta$ H2.** Representación de la actividad de: (A) TEC1, (B)  $\Delta$ H1 y (C)  $\Delta$ H2 frente al doble mutante  $\Delta$ H1 $\Delta$ H2 en distintas condiciones de sustrato NAD(P)H y de cofactor (FMN y FAD). Se muestra la actividad relativa de cada reacción entendida como la caída en la absorbancia por unidad de tiempo (seg).

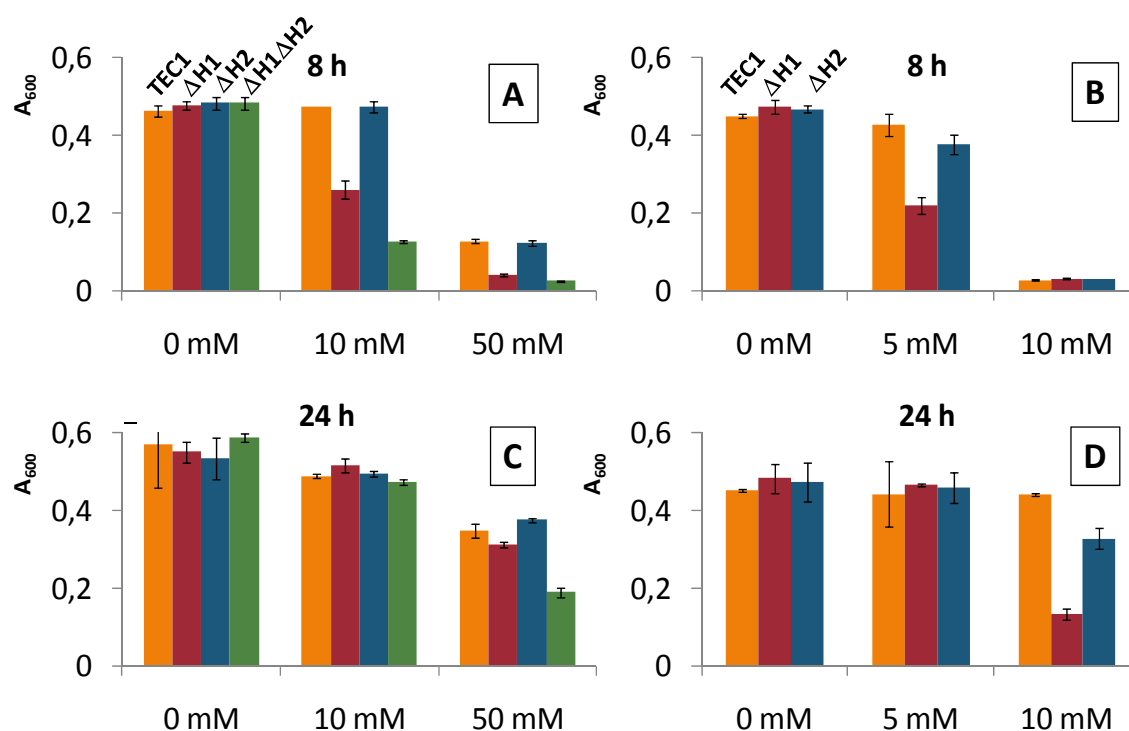
Estos datos sugieren que aunque ambas proteínas ArsH de *P. putida* KT2440 están implicadas en la reacción NADPH flavín oxidorreductasa, la proteína ArsH1 posee mayor relevancia en las condiciones utilizadas, ya que, un mutante  $\Delta$ H1 presenta menor actividad en el ensayo realizado. Así pues la eficiencia de la reacción en los ensayos de actividad oxidorreductasa relativa utilizando NADPH como sustrato y FMN como cofactor sería: **TEC1 >  $\Delta$ H2 >  $\Delta$ H1 >  $\Delta$ H1 $\Delta$ H2** (Fig. 22).



**Fig. 22. Ensayo de actividad NADPH:FMN oxidorreductasa relativa en TEC1,  $\Delta$ H1,  $\Delta$ H2 y  $\Delta$ H1 $\Delta$ H2.** Se muestra la actividad relativa de cada reacción entendida como la caída en la absorbancia por unidad de tiempo (seg).

### 1.3. Los genes *arsH* de *P. putida* KT2440 son funcionales. Fenotipos de las cepas mutantes frente a arsénico

Una vez explorada mediante los ensayos de actividad enzimática la posible función de las proteínas ArsH de *P. putida* KT2440, se estudió el posible papel de estas NADPH flavín oxidorreductasas en la resistencia a arsénico. Con este fin, se realizaron curvas de crecimiento frente a As(V) y As(III) en las distintas cepas mutantes  $\Delta H1$ ,  $\Delta H2$  y  $\Delta H1\Delta H2$  utilizando a *P. putida* TEC1 como control. De este modo, se determinó la importancia de los genes *arsH1* y *arsH2* ante ambos tóxicos. En la **Fig. 23** se observó el crecimiento celular (medido como  $A_{600}$ ) de las distintas cepas mutantes y silvestre frente a diferentes concentraciones de arsenato (10 y 50 mM) y arsenito (5 y 10 mM). En ambos casos se observó cómo la ausencia de *arsH1* afectó en gran medida a la tolerancia del microorganismo a arsénico. En el caso de  $\Delta H2$ , los efectos son menos claros, aunque se hacen notables cuando se observa el fenotipo del doble mutante, claramente la cepa más sensible.

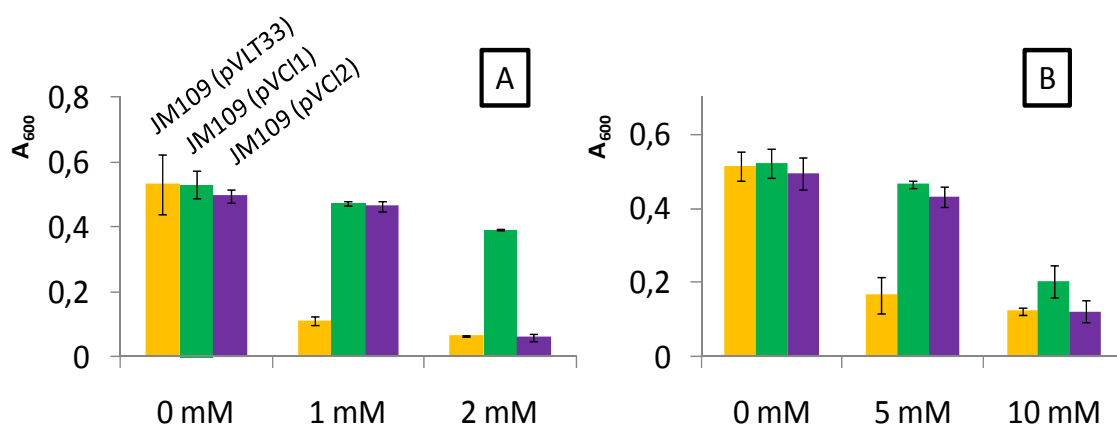


**Fig. 23. Crecimiento de las cepas TEC1,  $\Delta H1$ ,  $\Delta H2$  y  $\Delta H1\Delta H2$  a distintas concentraciones de As(V) y As(III).** (A) y (C) muestran el crecimiento de las cepas indicadas frente a concentraciones de As(V) a 8 h y 24 h, respectivamente. (B) y (D) indican el crecimiento frente a las concentraciones de As(III) correspondientes a 8 y 24 h. Las curvas de crecimiento se realizaron en placas de 96 pocillos, con medio LB suplementado con uracilo, añadiendo As(V) o As(III) cuando fue necesario. La  $T^a$  de incubación fue siempre 30°C. Se realizaron triplicados biológicos y duplicados técnicos.



#### 1.4. Los genes *arsH* de *P. putida* KT2440 son funcionales en *E. coli*. Expresión heteróloga

Se utilizaron los vectores de amplio espectro de hospedador pVH1 y pVH2 (ver construcciones en punto 4.3 del ANEXO I) para expresar los genes *arsH* de *P. putida* KT2440 en *E. coli*. Se utilizó como fondo genético la cepa *E. coli* JM109. Los resultados que se muestran en la **Fig. 24** indicaron que tanto ArsH1 como ArsH2 eran funcionales en *E. coli* cuando se sobreexpresaban, incrementando la resistencia de la bacteria tanto frente a As(V) como a As(III). La proteína ArsH1 fue la que proporcionó mayor tolerancia, observándose este dato fundamentalmente en altas concentraciones de As(III).



**Fig. 24. Resistencia a arsénico de *E. coli* JM109 expresando los distintos genes *arsH* de *P. putida* KT2440. (A) Resistencia frente a As(III) en las concentraciones indicadas. (B) Resistencia a As(V) en las concentraciones indicadas. Los experimentos fueron realizados en placas de 96 pocillos utilizando medio LB con Km e incubando 48 h a 37°C. Se realizaron triplicados biológicos y duplicados técnicos en los experimentos.**

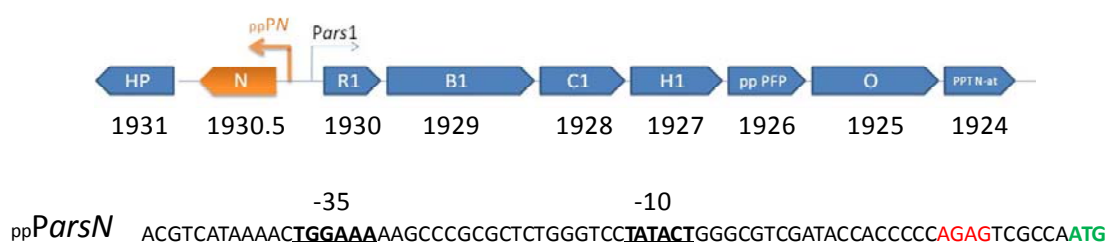
## 2. Gen *arsN* de *P. putida* KT2440

### 2.1. Identificación y anotación del gen *arsN* (PP\_1930.5) en el genoma de *P. putida* KT2440

Hasta hoy, la región del genoma de *P. putida* KT2440 comprendida entre las ORF's PP\_1930 (gen *arsR1*) y PP\_1931 (putativa transposasa de la familia IS4) se encontraba anotada en las bases de datos como región intergénica (*Pseudomonas Genome Database*; Winsor *et al.*, 2009). Sin embargo, hemos podido describir por homología de

secuencias, que en esta región de 836 pares de bases se codifica una proteína (ArsN) con similitud a acetiltransferasas que podría estar involucrada en la resistencia a arsénico del organismo. Esta hipótesis se basa en la descripción previa del gen *arsN*, aislado a partir de una librería metagenómica de fangos en una planta de tratamiento de agua de una industria de pesticidas en la India (Chauhan *et al.*, 2009).

Utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *arsN* anteriormente descrito, y el programa NCBI TBLASTN 2.2.21 (Altschul *et al.*, 1997), se pudo observar que, la proteína más parecida a ArsN sería la que correspondería a la secuencia de la región intergénica (2177156-2177593) de *P. putida* KT2440 (47 % de identidad y  $1e-32$  de valor-E). También se pudo determinar una probable región promotora *ParsN* (Fig. 25) utilizando el programa *BPRM* (Softberry, Mt. Kisco, NY; <http://www.softberry.com/berry.phtml>).

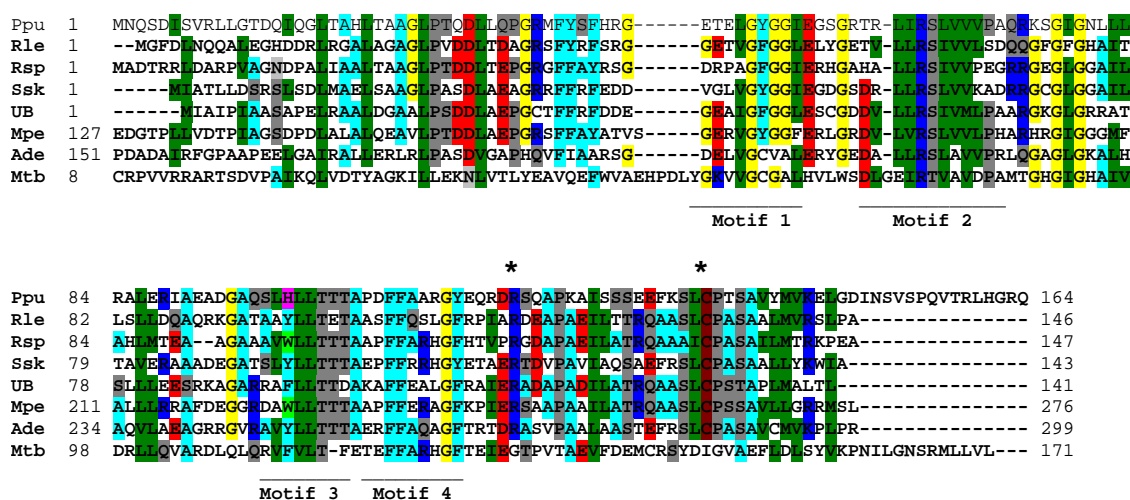


**Fig. 25. Localización del gen *arsN* de *P. putida* KT2440 y región promotora hipotética.** Se indica en naranja la posición que ocupa *arsN* respecto al operón *ars1* así como la orientación del mismo. En *ParsN* se encuentran subrayadas y resaltadas las cajas -10 y -35 hipotéticas. En rojo, el sitio de unión a ribosoma (RBS) y en verde el primer aminoácido (metionina) del gen.

Los análisis filogenéticos y de secuencias de los homólogos ArsN encontrados *in silico* por *BLAST*, demuestran la amplia distribución de ArsN en muchos otros genomas bacterianos (Chauhan *et al.*, 2009).

Respecto a la estructura de la proteína ArsN de *P. putida* KT2440 (164 a.a., Pm=17838.75) se reveló, utilizando como herramienta bioinformática el programa SMART (Schultz *et al.*, 1998), la presencia de un dominio conservado (ArgA) de la subfamilia glutamato *N*-acetiltransferasas (GNAT, pfam00583) desde el aminoácido 43 al 115 con un valor-E de  $1.2e-05$ . ArgA se encarga de sintetizar *N*-acetilglutamato en la ruta *de novo* de biosíntesis de arginina (Xu *et al.*, 2006).

Cuando se alinearon los homólogos de ArsN con ArgA (**Fig. 26**) aparecieron los cuatro dominios descritos previamente en las glutamato *N*-acetiltransferasas (Xu *et al.*, 2006) aunque con algunas diferencias bien conservadas en todos los grupos. Por un lado existía un residuo de ácido glutámico conservado en el motivo 1 de ArsN en lugar de en el motivo 2 de ArgA (donde había presente una leucina). Además se encontraban una arginina y una leucina perfectamente conservadas en todas las proteínas ArsN que no estaban presentes en las glutamato *N*-acetiltransferasas.



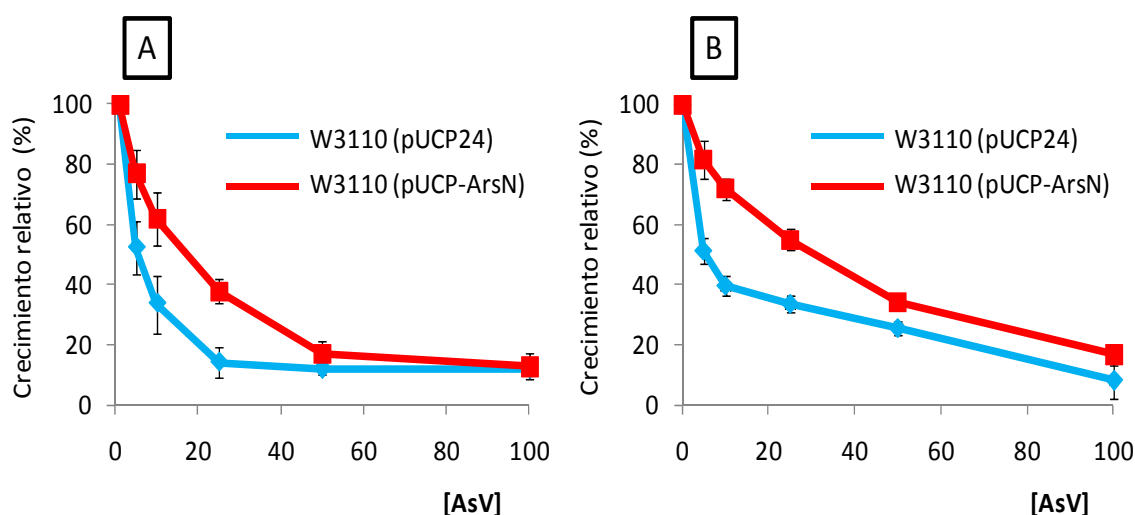
**Fig. 26. Alineamiento de distintos homólogos de ArsN con ArgA de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).** Se representan genes *arsN* de *P. putida* KT2440 (Ppu), *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 3841 (Rle), *Rhodobacter sphaeroides* ATCC17025 (Rsp), *Sphingomonas* sp. SKA58 (Ssk), librería metagenómica (UB) (Chauhan *et al.*, 2009), *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Mpe), *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C (Ade). Se encuentran subrayados los motivos conservados de ArgA. Los residuos de arginina y cisteína conservados en los homólogos *arsN* se presentan marcados con un asterisco.

Por tanto, parece clara la presencia de este gen no descrito previamente (*arsN*) en el genoma de *P. putida* KT2440. Además, el hecho de estar contiguo (en sentido divergente) al operón *ars1* en nuestra cepa de estudio, así como la clara asociación de esta proteína con genes de tolerancia a arsénico en otros organismos, la convierte en candidata a estar implicada en la resistencia al tóxico.

## 2.2. El gen *arsN* de *P. putida* KT2440 es funcional frente a As(V)

Para demostrar la funcionalidad del gen *arsN* se siguió una estrategia similar a la descrita en el único trabajo existente con una proteína homóloga (Chauhan *et al.*, 2009). Se construyó el plásmido pUCP24-ArsN que contiene el gen *arsN* de *P. putida*

KT2440, con su propia RBS y expresado bajo el promotor *P<sub>lac</sub>* (Detalles punto 4.6 del ANEXO I) y se intentó determinar si PP\_1930.5 presentaba el mismo comportamiento que el gen descrito previamente (incrementando la resistencia a arsenato sólo en presencia de la bomba de expulsión de arsenito ArsB). La cepa hospedadora transformada con pUCP24-ArsN fue *E. coli* W3110 (ver **Tabla 3**) y presentó niveles de crecimiento (medido como  $A_{600}$ ) sensiblemente mayores que aquella transformada con el vector vacío pUCP24 en presencia de arsenato, en medio de cultivo LB+Gm a distintos tiempos (**Fig. 27**). Sin embargo, cuando se utilizó AW3110 (cepa de *E. coli* supersensible al arsénico al ser un mutante *arsRBC*) como hospedador, la presencia única de ArsN de *P. putida* KT2440 no fue suficiente para aumentar la resistencia del microorganismo frente a arsenato (datos no mostrados).



**Fig. 27. Resistencia frente a arsenato de *E. coli* con y sin el gen *arsN* de *P. putida* KT2440.** La resistencia se evaluó utilizando como fondo a *E. coli* W3110 y empleando los vectores pUCP24 como control y pUCP-ArsN. Se usó LB con Gm como medio de cultivo, añadiendo concentraciones de As(V) como se indica. Las gráficas representan el crecimiento relativo en % respecto a controles sin As(V), incubando a 37°C durante **(A)** 8 h y **(B)** 24 h. Se muestra la media de triplicados biológicos con duplicados técnicos, en cada caso.

Así pues, podemos decir que la proteína PP\_1930.5 (ArsN) cumple un papel de ayuda al sistema de resistencia (al menos a arsenato) cuando se sobreexpresó en *E. coli*. Además, se requirió la presencia de las proteínas ArsC y/o ArsB para el aumento de esta tolerancia.

### **Capítulo III.**

**Resistencia al herbicida Fosfinotricina (PPT) en *P. putida* KT2440.**

**Regulación subrogada a la presencia de arsénico**

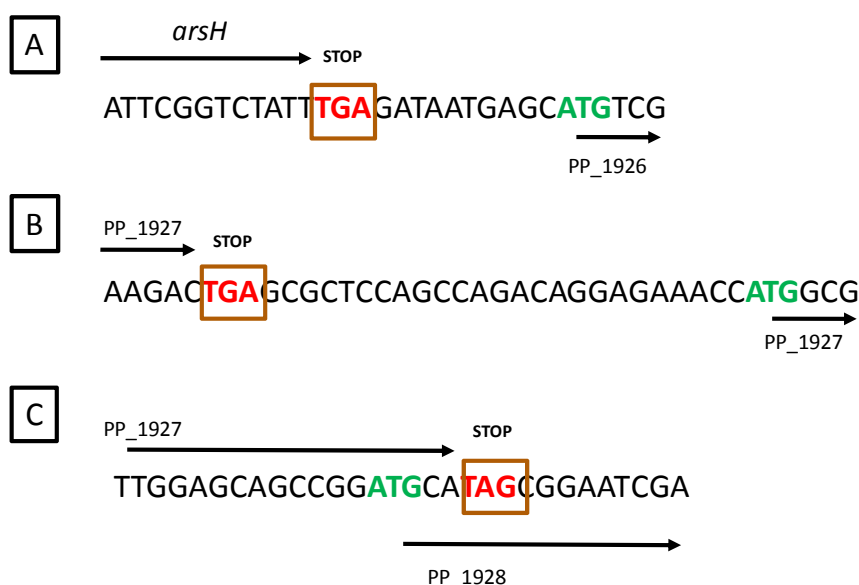


### 1. El operón *ars1* de *P. putida* KT2440 está constituido por 3 genes más

Hasta ahora, la configuración descrita para los 2 operones *ars* de *P. putida* KT2440 (integrada por *arsRBCH*) era idéntica. En el presente trabajo se ha podido verificar la presencia de otros 3 genes integrados en el operón exógeno *ars1*. Estos genes, PP\_1924, PP\_1925 y PP\_1926, codificaban para una PPT-*N*-acetil transferasa, una monooxigenasa y una proteína de la familia de las fosfatasas, respectivamente. Todos se encontraron anotados como putativos (**Tabla 9**) y no presentaban espacio intergénico suficiente para encerrar otros promotores (**Fig. 28**).

**Tabla 9. Operón *ars1* de *P. putida* KT2440.** Se encuentra integrado por 7 genes, orientados en el mismo sentido.

Gen	Coodenadas	Nombre	Función
PP1930	2176572-2176955	<i>arsR1</i>	Regulador Transcripcional
PP1929	2175259-2176539	<i>arsB1</i>	Expulsión As(III)
PP1928	2174774-2175259	<i>arsC1</i>	Conversión de As(V) en As(III)
PP1927	2174037-2174759	<i>arsH1</i>	Procesos celulares
PP1926	2173529-2174029	putativa fosfatasa	??
PP1925	2172421-2173500	putativa monooxigenasa	??
PP1924	2171868-2172425	putativa PPT <i>N</i> -acetil transferasa	Procesos celulares



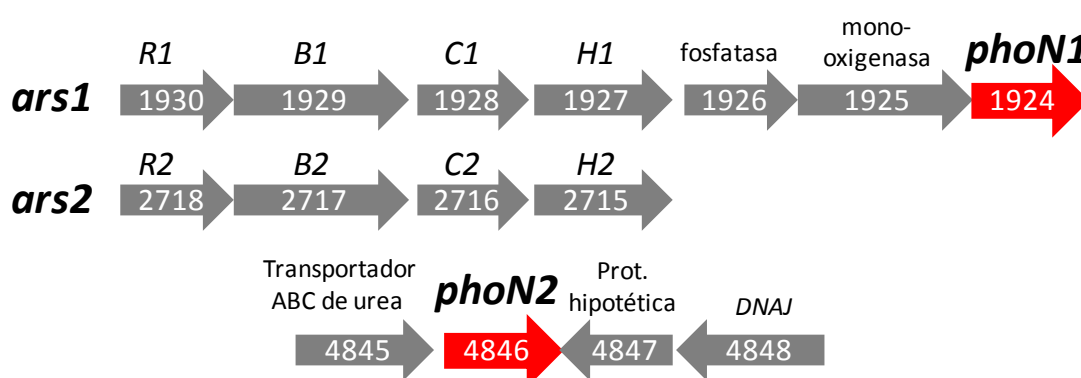
**Fig. 28. Regiones intergénicas entre *arsH*, PP\_1926, PP\_1927 y PP\_1928 de *P. putida* KT2440.** Se muestran en rojo y en verde los codones de terminación e iniciación, respectivamente, para los genes indicados.

En el presente trabajo se estudió la funcionalidad del gen PP\_1924 (*phoN1*) de los tres nuevos integrantes de la agrupación génica. Esta elección se debió al tratarse de una actividad sobre la Fosfotricina (PPT), un producto químico muy interesante utilizado ampliamente como compuesto activo de numerosos herbicidas y como marcador de selección en plantas transgénicas.

## 2. Actividad Fosfotricina (PPT)-N-acetil transferasa en *P. putida* KT2440

### 2.1. *P. putida* KT2440 posee 2 genes anotados como PPT-N-acetil transferasas

Utilizando la homología de secuencias con el programa *BLAST*, se pudo determinar la presencia de 2 genes, localizados en diferentes regiones del genoma de *P. putida* KT2440, anotados con la misma función PPT-N-acetiltransferasa (Fig. 29). Se trata de PP\_1924 (*phoN1*), integrante del operón *ars1*, y de PP\_4846 (*phoN2*). Con el objeto de poder estudiar ambos genes, se realizaron mutantes simples y doble (punto 3.4 del ANEXO I) siguiendo los pasos de los puntos 6.5.1 y 6.5.3 del apartado Materiales y Métodos, respectivamente. Además se desarrollaron los plásmidos pVPPT1 y pVPPT2 (punto 4.5 del ANEXO I), conteniendo los genes *phoN1* y *phoN2*, para complementar las deleciones (6.5.4 Materiales y Métodos).

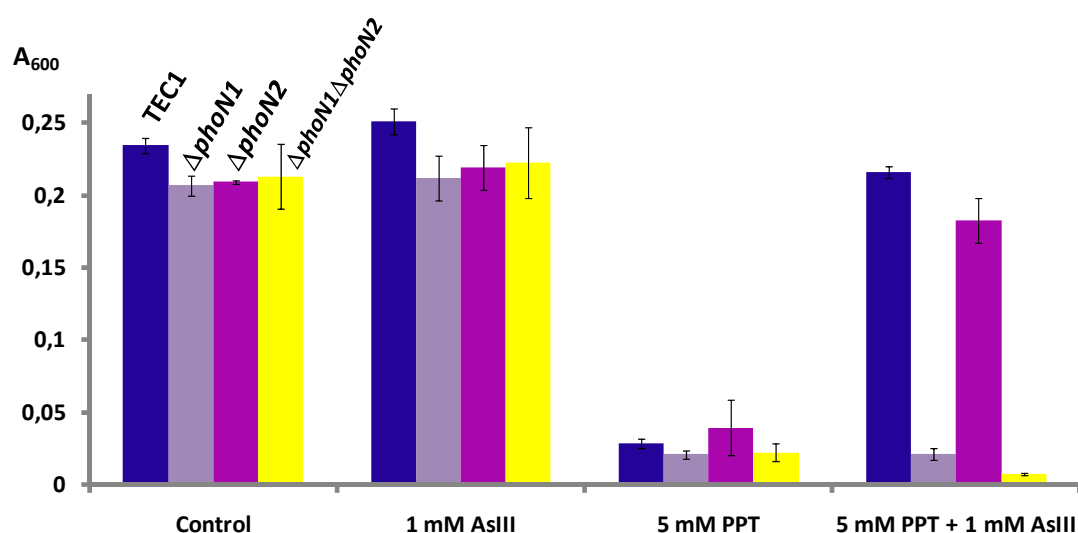


**Fig. 29. Distribución de los genes *phoN* en *P. putida* KT2440.** Se muestran sus localizaciones respecto a los operones *arsRBCH* y su entorno genético



## 2.2. *phoN1* (PP\_1924) está vinculado al operón *ars1*

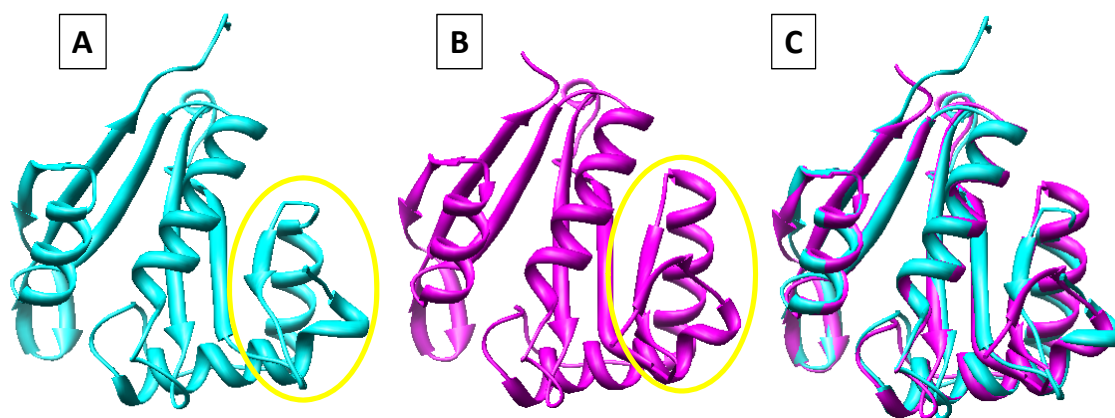
A la vista de la organización del agrupamiento génico *ars1* se puede inferir que la regulación del gen *phoN1* de *P. putida* KT2440 se lleva a cabo a través del regulador transcripcional *arsR1* a partir del promotor *Pars1*. Para demostrar la dependencia de la expresión de *phoN1* con *Pars1*, se llevó a cabo el siguiente experimento: una vez estimada la concentración inhibitoria de PPT para *P. putida* KT2440 (6 mM, en placa de MM cit, incubando 48 h) se utilizó 5 mM de PPT para examinar el crecimiento de *P. putida* TEC1 y los respectivos mutantes de delección  $\Delta phoN1$ ,  $\Delta phoN2$  y  $\Delta phoN1\Delta phoN2$ . Estas condiciones se utilizaron como control del crecimiento de las mismas cepas, en idénticas concentraciones de PPT, pero utilizando simultáneamente una concentración de As(III) de 1 mM, subinhibitoria para *P. putida* KT2440 pero suficientemente alta para disparar a los operones *ars*. En los casos del organismo silvestre TEC1 y  $\Delta phoN2$  se pudo observar claramente (**Fig. 30**) que al añadir arsénico como inductor de los genes *ars*, se induce además la resistencia a PPT, indicando una co-expresión de *phoN1*, volviendo a las cepas mucho más tolerantes frente al herbicida. Por el contrario, en las situaciones donde el gen *phoN1* se encuentra deletado (mutante simple y doble mutante), la resistencia no aumentó con la adición de As al medio.



**Fig. 30. Resistencia a PPT en *P. putida* TEC1,  $\Delta phoN1$ ,  $\Delta phoN2$  y  $\Delta phoN1\Delta phoN2$  a distintas condiciones de +/- As(III).** Se estudió la resistencia de las distintas cepas (usando A<sub>600</sub>) en placas de 96 pocillos, utilizando MM cit Ura como condiciones Control, añadiendo As(III) y PPT a la concentración indicada en cada caso. Experimento realizado con triplicados biológicos y duplicados técnicos a 30°C y 12 h de incubación.

### 2.3. Análisis comparativo entre *phoN1* y *phoN2* de *P. putida* KT2440

**2.3.1. Estructuras tridimensionales, secuencia de aminoácidos, % GC e índice de adaptación de codones (IAC).** Los modelos de las proteínas PhoN1 y PhoN2 de *P. putida* KT2440 se realizaron a partir de la homología de sus secuencias con las de mayor similitud de la base de datos *SwissModel* (Arnold *et al.*, 2006), utilizando el programa *UCFS Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004). Para ambos modelos se utilizó la estructura de la proteína con mayor identidad en las bases de datos. En el caso de PhoN1, la referencia utilizada por el programa fue ACIAD1637 de *Acinetobacter baylyi* ADP1 (27.1 % de identidad de secuencia, valor-E= 1.00e-22), mientras que para PhoN2 lo fue PA4866 de *Pseudomonas aeruginosa* (78.3 % identidad de secuencia, valor-E=1.06e-68). En la **Fig. 31** se advierte cómo la aparente estructura tridimensional del monómero de ambas proteínas es bastante similar con algunos detalles diferentes marcados en los monómeros individuales. De todos modos, debido a que PhoN1 de *P. putida* KT2440 no tiene una identidad significativamente alta con la referencia usada, el modelo debe tomarse como orientativo.



**Fig. 31. Representación de la estructura tridimensional de los monómeros de PhoN1 y PhoN2 de *P. putida* KT2440. (A) PhoN1; (B) PhoN2. (C) Superposición de las estructuras hipotéticas de PhoN1 y PhoN2 de *P. putida* KT2440. Se muestra en amarillo la zona menos conservada en las estructuras.**

Además, se alinearon las secuencias de aminoácidos entre ambas proteínas PhoN de *P. putida* KT2440, utilizando la opción de *BLAST bl2seq* (**Fig. 32**). Se observó que la identidad entre ambas era bastante baja (35 %) en una familia que está muy bien conservada.

**Identidad = 56/156 (35%), Positivos = 70/156 (44%), Gaps = 1/156 (0%)**

```

PhoN1 6   DIRVARPEDAEEIQIYAPIVLNTAISFEEAVPSVEQMRERISTTLQT-YPYLVAVREGR 64
          +IR A  D  I  IY  VLNT  + E  ++  +      Q  YP LVAV E
PhoN2 4   EIRDALHTDVPFGILDIYNDAVLNTTAIWNETPVDLDNRQAWFEARAQQGYPILVAVDETG 63
          EIRDA LHTDVPFGILDIYNDAVLNTTAIWNETPVDLDNRQAWFEARAQQGYPILVAVDETG
PhoN1 65  VVGAYASQHRARAAYRWAVDVTIVYVAEGQRRSGIARQLYDVLLPVLKRLGYRSAYAGIA 124
          V+GYA      R  +R  V+ +VYV  QR  G+  L  L+  +  G  A  I
PhoN2 64  VLGYSFSGDWRPFEGFRLTVEHSVYVRSDQRGKGLGPFVLMALVERARGCGKHMVAAIE 123
          VLGYSFSGDWRPFEGFRLTVEHSVYVRSDQRGKGLGPFVLMALVERARGCGKHMVAAIE
PhoN1 125 LPNEGSVGLHERLGFQHGTFPQVGFKLDAWHDVGY 160
          N  SV LHERLGF  G  PQVG K  W D+ +
PhoN2 124 RGNAAASVRLHERLGFVVTGQMPQGVKFGRWLDLTF 159
          RGNAAASVRLHERLGFVVTGQMPQGVKFGRWLDLTF

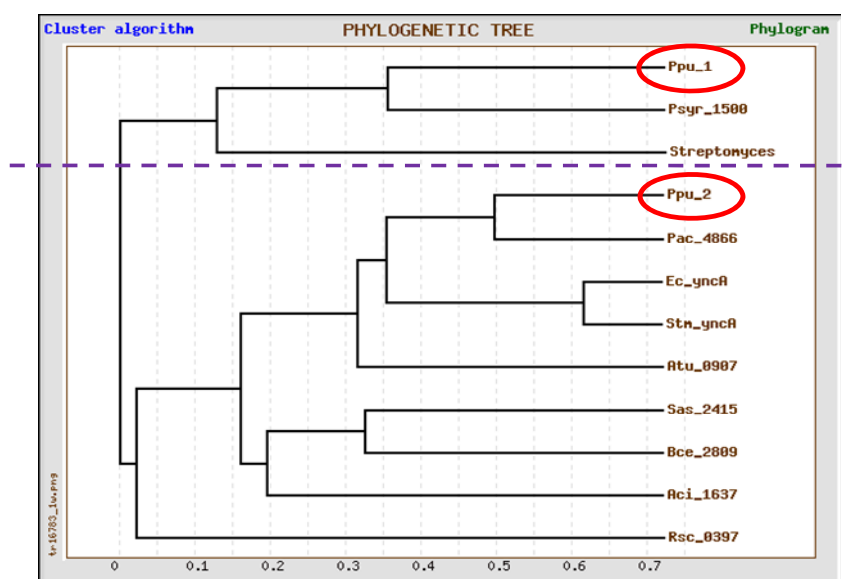
```

**Fig. 32. Alineamiento entre PhoN1 y PhoN2 de *P. putida* KT2440.**

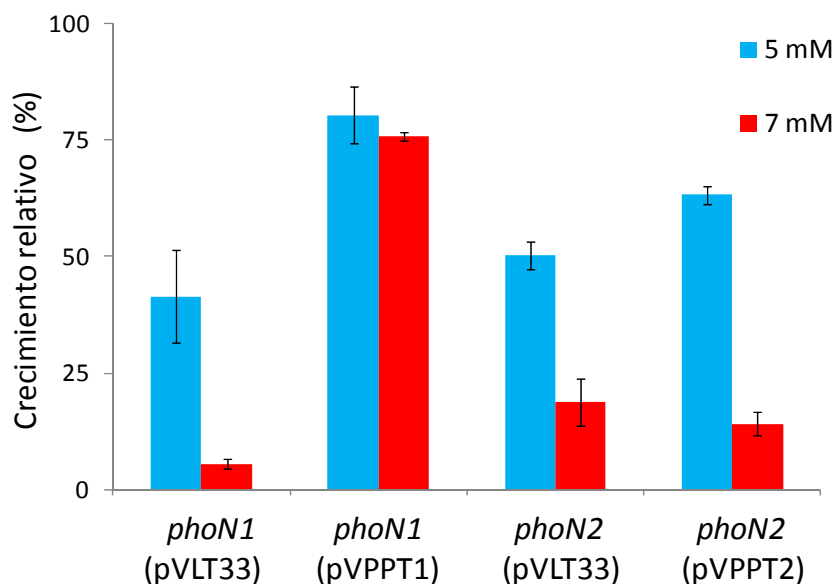
Por último, también se advirtieron diferencias significativas en la composición de GC de la secuencia de *phoN1* respecto de *phoN2*, siendo de 58.78 % y 63.64 %, respectivamente, así como en la distribución del uso de codones (punto 8 del ANEXO I).

**2.3.2. *phoN1* y *phoN2* pertenecen a familias diferentes de proteínas.** Al alinearse distintas proteínas anotadas en los genomas como PPT-*N*-acetil transferasas (por el método *Clustalw*) y utilizarse el programa de distribución filogenética (con salida *Output Tree Type PHYLP*) del software de libre acceso *GeneBee* ([http://genebee.msu.su/services/phtree\\_reduced.html](http://genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html)), se identificaron claramente 2 familias de proteínas diferentes anotadas con la misma función. Los genes de *P. putida* KT2440 *phoN1* y *phoN2* se encuadraban en diferentes ramas del árbol (**Fig. 33**).

**2.3.3. *phoN1* está involucrado en la resistencia a L-PPT en *P. putida* KT2440.** Se estudió la resistencia a PPT de los distintos mutantes en los genes *phoN1* y *phoN2* y sus respectivas complementaciones. Se utilizó para ello el vector vacío pVLT33 y los plásmidos pVPPT1 y pVPPT2, que incluyen a *phoN1* y *phoN2*, respectivamente (**Fig. 34**). Se pudo observar cómo la cepa mutante  $\Delta phoN1$  (pVLT33) presentaba una elevada sensibilidad frente a las concentraciones de PPT utilizadas en el ensayo (5 y 7 mM), que era totalmente revertida cuando se sobreexpresaba el gen delecionado en la cepa  $\Delta phoN1$  (pVPPT1). Respecto a la cepa mutante  $\Delta phoN2$  (pVLT33) y su complementación  $\Delta phoN2$  (pVPPT2) no se apreciaron cambios significativos en la resistencia al tóxico.

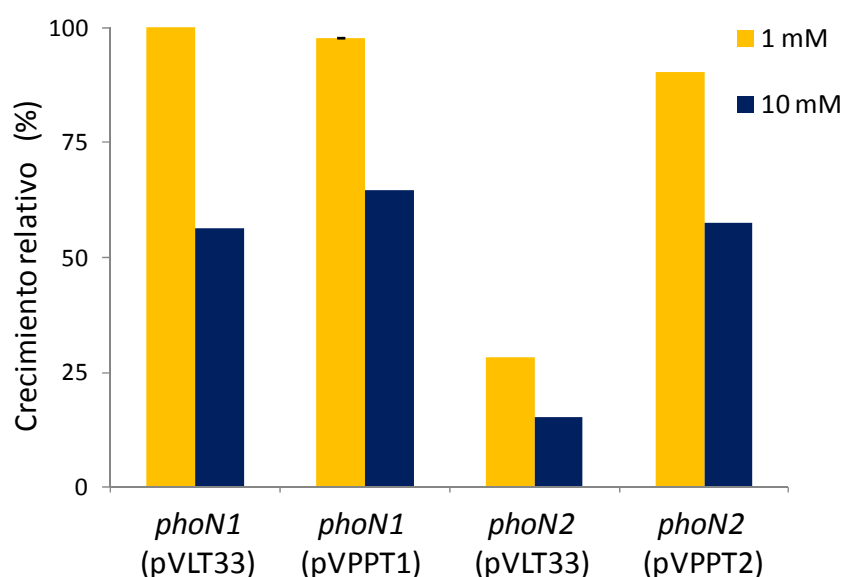


**Fig. 33. Distancia filogenética entre las 2 familias de proteínas anotadas como PPT-*N*-acetiltransferasas.** Se muestran con círculos rojos a *phoN1* (Ppu\_1) y *phoN2* (Ppu\_2) de *P. putida* KT2440. Se identifica a Psyr como *Pseudomonas syringae*, Pac como *Pseudomonas aeruginosa*, Ec como *Escherichia coli*, Stm como *Salmonella typhimurium*, Atu como *Agrobacterium tumefaciens*, Sas como *Staphylococcus aureus*, Bce como *Bacillus cereus*, Aci como *Acinetobacter* sp. y Rsc como *Ralstonia solanacearum*. La línea discontinua morada separa las 2 familias de proteínas PPT-*N*-acetil transferasas.



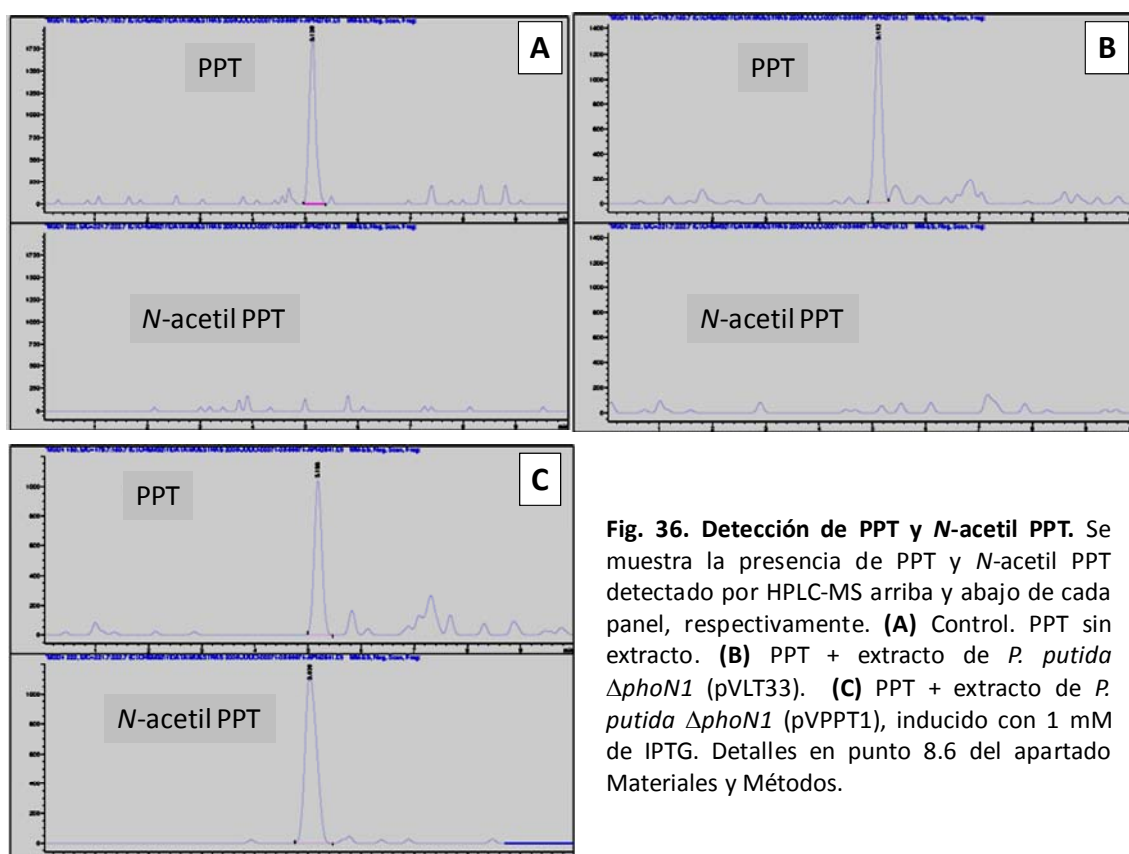
**Fig. 34. Resistencia a PPT de las cepas mutantes  $\Delta phoN1$  y  $\Delta phoN2$  complementadas.** Se utilizó MM cit ura Km como medio de cultivo con 1 mM de IPTG (para la sobreexpresión de los genes). El medio fue suplementando con las concentraciones de PPT indicadas. Se muestra el crecimiento relativo en % con respecto al control sin PPT de cada una de las cepas. Ensayos realizados en placas de 96 pocillos e incubadas 48 h a 30°C. Se realizaron triplicados biológicos y duplicados técnicos, en cada caso.

**2.3.4. *phoN2* determina la resistencia de *P. putida* KT2440 a MetSox.** La elevada identidad que presentó PhoN2 con el producto del gen PA4866 de *P. aeruginosa* (casi un 80 %) llevó a pensar que podría desempeñar un papel similar al descrito por esta proteína. Recientemente se ha demostrado que PA4866 se corresponde con una acetiltransferasa cuyo sustrato no es PPT sino Metionina Sulfoximina (MetSox; Davies *et al.*, 2007). Con el fin de estudiar la resistencia a MetSox por parte de las cepas mutantes en los genes *phoN1* y *phoN2* y sus respectivas complementaciones, se llevó a cabo un ensayo similar al anterior utilizando en este caso, distintas concentraciones (1 y 10 mM) de MetSox como agente tóxico (**Fig. 35**). En esta ocasión se muestra una clara sensibilidad ante el compuesto por parte de la cepa mutante  $\Delta phoN2$ , incluso a concentraciones bajas del mismo. La sensibilidad se restituye cuando se sobreexpresa el gen a través del plásmido pVPPT2, indicando el papel de *phoN2* en la resistencia a MetSox. Para los mutantes en *phoN1*, la presencia o ausencia del gen codificado por pVPPT1 parece no mostrar influencia alguna en la resistencia al tóxico.



**Fig. 35. Resistencia a MetSox de las cepas mutantes  $\Delta phoN1$  y  $\Delta phoN2$  complementadas.** Se utilizó MM cit ura Km como medio de cultivo con 1 mM de IPTG (para la sobreexpresión de los genes). El medio fue suplementando con las concentraciones de MetSox indicadas. Se muestra el crecimiento relativo en % con respecto al control sin MetSox de cada una de las cepas. Ensayos realizados en placas de 96 pocillos e incubadas 48 h a 30°C. Se realizaron triplicados biológicos y duplicados técnicos, en cada caso.

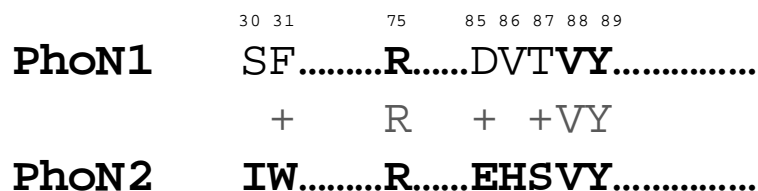
**2.3.5. PhoN1 de *P. putida* KT2440 transforma PPT en *N*-acetil PPT. Ensayos enzimáticos.** Se realizaron ensayos enzimáticos para determinar la acción de la proteína PhoN1 sobre la molécula PPT. Para ello, se utilizó el plásmido pVPPT1 que contiene el gen *phoN1* y se puede controlar la sobreexpresión al añadir IPTG. Tras ello, se prepararon extractos enriquecidos en el producto correspondiente, utilizando como control el extracto con el vector vacío pVLT33 (los detalles del ensayo se describen en el punto 8.6 del apartado Materiales y Métodos). Como indica la **Fig. 36** únicamente en el caso donde se sobreexpresa el gen *phoN1*, se observó inequívocamente un pico detectable (aunque no cuantificable) de *N*-acetil PPT en presencia de PPT, indicando así su participación en la conversión de una especie en otra.



**Fig. 36. Detección de PPT y *N*-acetil PPT.** Se muestra la presencia de PPT y *N*-acetil PPT detectado por HPLC-MS arriba y abajo de cada panel, respectivamente. **(A)** Control. PPT sin extracto. **(B)** PPT + extracto de *P. putida*  $\Delta phoN1$  (pVLT33). **(C)** PPT + extracto de *P. putida*  $\Delta phoN1$  (pVPPT1), inducido con 1 mM de IPTG. Detalles en punto 8.6 del apartado Materiales y Métodos.

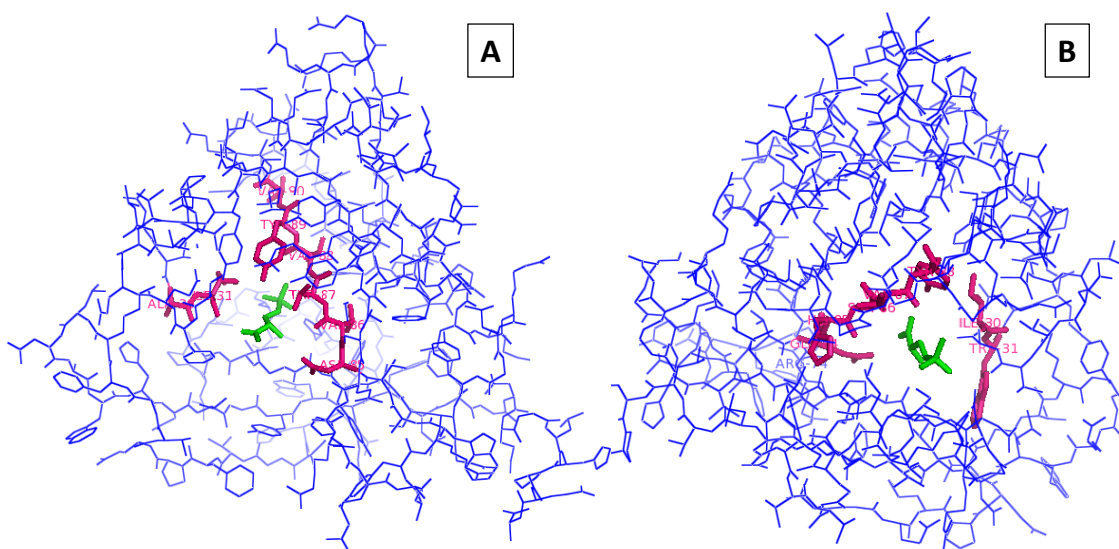
**2.3.6. El centro activo para MetSox no se conserva en *phoN1*.** Con el fin de establecer la diferencia de sustrato de las 2 proteínas PhoN1 y PhoN2, se estudió en detalle la estructura más posible de los centros activos de cada una de ellas. El de aquellas proteínas que interactúan con MetSox (proteínas *pita*), se encuentra perfectamente conservado en todas ellas siendo: Ile30, Trp31, Arg75, Phe77, Glu85, His86, Ser87, Val88 y Tyr89 (Davies *et al.*, 2007). Se analizaron, por comparación de secuencias, los

residuos presentes en estas posiciones para ambas proteínas PhoN de *P. putida* KT2440. Como indica la **Fig. 37**, la proteína PhoN2 conserva perfectamente el centro activo mientras que en el caso de PhoN1, 5 de los 8 aminoácidos no coinciden.



**Fig. 37. Aminoácidos del centro activo de las proteínas que interactúan con MetSox.** Se muestran resaltados los que coinciden con el consenso (utilizando la proteína PA4846 de *P. aeruginosa* como modelo).

Utilizando los modelos de la **Fig. 31** y haciendo un *docking* molecular basado en la complementación de la forma con el algoritmo *PatchDock* (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005), se pudo observar la importancia de estos residuos (30, 31, 75, 86, 87, 88 y 89) en la interacción con la molécula correspondiente. La **Fig. 38** muestra el sitio hipotético de interacción de PhoN1 con PPT y de PhoN2 con MetSox (los candidatos preferentes en el *docking*), resaltando los aminoácidos que se han propuesto como centro activo.

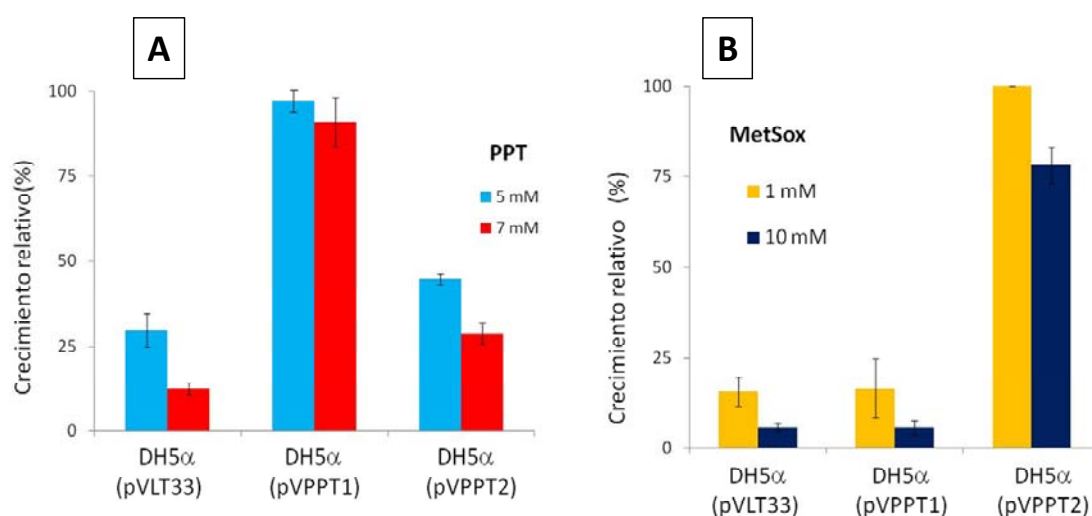


**Fig. 38. Docking molecular. (A)** Monómero de PhoN2 con MetSox. **(B)** Monómero de PhoN1 con PPT. Se representa en azul la totalidad de residuos de las proteínas. Las moléculas MetSox y PPT y los residuos del centro activo se muestran en verde y rosa, respectivamente. Las imágenes se generaron con PyMOL (Copyright © 2009 DeLano Scientific LLC).



## 2.4. Los genes *phoN1* y *phoN2* de *P. putida* KT2440 son funcionales en *E. coli*

Para verificar la funcionalidad de los genes *phoN1* y *phoN2* en un contexto heterólogo se transformaron los plásmidos pVPPT1 y pVPPT2 en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , obteniendo así DH5 $\alpha$  (pVPPT1) y DH5 $\alpha$  (pVPPT2) respectivamente. En ellas se realizaron ensayos de resistencia frente a los tóxicos PPT y MetSox (**Fig. 39**) en relación a su control DH5 $\alpha$  (pVLT33). Se pudo observar cómo ambos genes son funcionales al ser expresados de manera heteróloga respondiendo de manera diferencial ante ambos agentes. En el caso de la resistencia a PPT, la cepa donde se encuentra el plásmido que contiene a *phoN1* (el vector pVPPT1), fue visiblemente la más resistente al tóxico. También es cierto que pVPPT2 proporcionó una cierta actividad residual de resistencia a PPT, aunque siempre mucho menor a pVPPT1, en las condiciones ensayadas. Respecto a la resistencia a MetSox, se observó claramente que la resistencia se encontraba codificada en *phoN2* (sobreexpresado desde el plásmido pVPPT2).



**Fig. 39. Resistencia a PPT y MetSox de *E. coli*, expresando *phoN1* y *phoN2* de *P. putida* KT2440.**

Se utilizó MM glu Km como medio de cultivo con 1 mM de IPTG (para la sobreexpresión de los genes). El medio fue suplementando con las concentraciones de **(A)** PPT y **(B)** MetSox indicadas. Se muestra el crecimiento relativo en % con respecto al control sin PPT y MetSox de cada una de las cepas complementadas. Ensayos realizados en placas de 96 pocillos e incubadas 24 h a 37°C. Se realizaron triplicados biológicos y duplicados técnicos, en cada caso.



## **Capítulo IV.**

### **Análisis de la regulación de la expresión de los operones *ars* de *P. putida* KT2440**



## 1. Estudio de los promotores putativos *Pars1* y *Pars2*

### 1.1. Secuencias

Para poder determinar la región promotora de cada uno de los operones *ars* de *P. putida* KT2440, se utilizaron distintas aproximaciones bioinformáticas. Con la ayuda del programa *BPROM*, del paquete *SoftBerry*, se pudieron predecir los promotores hipotéticos para cada uno de los casos. Además este programa estima las cajas -10 y -35 al tratarse de promotores dependientes del factor de transcripción sigma-70 ( $\sigma 70$ ). Por otro lado, con el programa *RNAfold* se buscaron las zonas palindrómicas del promotor (**Fig. 40**), donde a menudo se encuentran las regiones operadoras para los reguladores transcripcionales (Busenlehner *et al.*, 2003).

```

> Pars1          -35          -10          RBS
TAAATATCTGCTTTACCGCATATTCGAATAGTCATATATTCGGAATTCAGATATTGGCCGTACGCGCATTCCCAGGAGGTTCACATG
..((((((((((.....)))))))))..

> Pars2          -35          -10          RBS
CAGGAAGGCTTGCTAGCACATATGGAAATACGTATATTCGGTTTTCCGTATGTACAGGCACCCCCATG
..((((((((((.....)))))))))..

```

**Fig. 40. Putativos promotores *Pars1* y *Pars2*.** Las regiones correspondientes a las cajas -35 y -10 de cada uno de los casos se encuentran subrayadas. Se indica con color azul el primer aminoácido (metionina) de los reguladores *arsR*. En naranja se indican las RBS y en rojo, la zona del operador para cada caso basado en el consenso para la familia SmtB/ArsR (tgtgATTTAATCATATG CG TTTTGGTTATGtgtt). Los paréntesis indican la zona palindrómica.

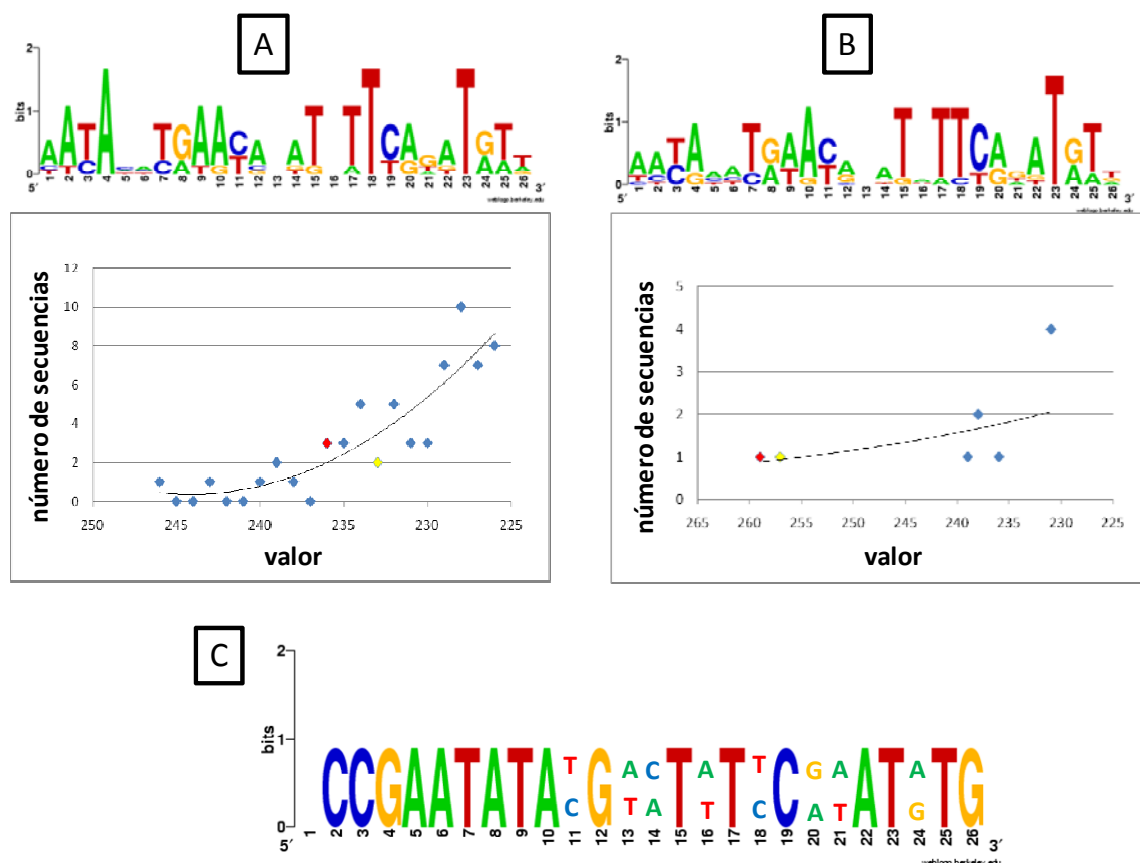
### 1.2. Especificidad de unión de ArsR1 y ArsR2 a las regiones operadoras

Se estudió *in silico* la especificidad de unión de las distintas proteínas ArsR de *P. putida* KT2440 a las zonas operadoras correspondientes. Un primer resultado fue descartar la posibilidad de regulación más allá del propio promotor *ars* ya que no existía ninguna región intergénica en el genoma de *P. putida* KT2440 con las características propias del consenso de unión a ADN de la familia de reguladores ArsR (Busenlehner *et al.*, 2003). Este estudio también indicó un alto grado de identidad en la secuencia operadora de los dos promotores, sugiriendo una posible regulación cruzada entre ambos sistemas *ars*. Para estudiar esto en mayor profundidad, se hizo una predicción de los sitios de

unión a ADN de los miembros de la familia SmtB / ArsR utilizando un conjunto de aplicaciones de la plataforma *EMBOSS* (<http://emboss.sourceforge.net/>).

Para esto, el genoma completo de *P. putida* KT2440 fue bajado desde el banco de datos de *Pseudomonas Genome Database* (<http://www.pseudomonas.com/>). Las secuencias no codificantes del genoma (secuencias intergénicas), equivalentes a un 12.5 % del total, fueron extraídas con la aplicación *coderet*. Después, se generó una matriz de similitud de los homólogos caracterizados de la familia (Busenlehner *et al.*, 2003) con la aplicación *prophecy*. La matriz de puntuación generada fue entonces utilizada para la búsqueda de secuencias homólogas en el genoma no codificante de *P. putida* KT2440 con la ayuda de la aplicación *prophet*. Los resultados se clasificaron por el valor obtenido basado en la matriz utilizada (cuanto mayor es el valor, mayor el número de bases idénticas al consenso) en unidades arbitrarias. Una vez generado el primer análisis se creó una segunda matriz de puntuación, añadiéndose a la primera las secuencias identificadas para los promotores *Pars1* y *Pars2*. Las representaciones de los consensos de secuencias fueron generadas con el programa *WebLogo* (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

Además, con el alineamiento de las secuencias correspondientes se pudo determinar que existe una región operadora muy bien definida casi idéntica para los dos promotores *ars* del genoma de *P. putida* KT2440.



**Fig. 41. Análisis *in silico* de la unión de ArsR1 y ArsR2 a regiones intergénicas de *P. putida* KT2440.** En el panel (A) se puede ver el consenso de la región de unión a ADN utilizando los 7 homólogos de la familia SmtB / ArsR descritos (Busenlehner *et al.*, 2003). La gráfica de abajo determina el número de secuencias intergénicas en *P. putida* KT2440 respecto del valor o número de bases idénticas al consenso (en unidades arbitrarias). En rojo se muestra el grupo que incluye a *Pars1* y en amarillo a *Pars2*. (B) Se incluye *Pars1* y *Pars2* a los 7 homólogos anteriores del panel (A). En la gráfica se puede ver cómo tanto *Pars1* como *Pars2* tienen, con diferencia, los mayores valores. Se indica así su especificidad por las regiones promotoras. (C) Identidad entre operadores *ars* en *P. putida* KT2440.

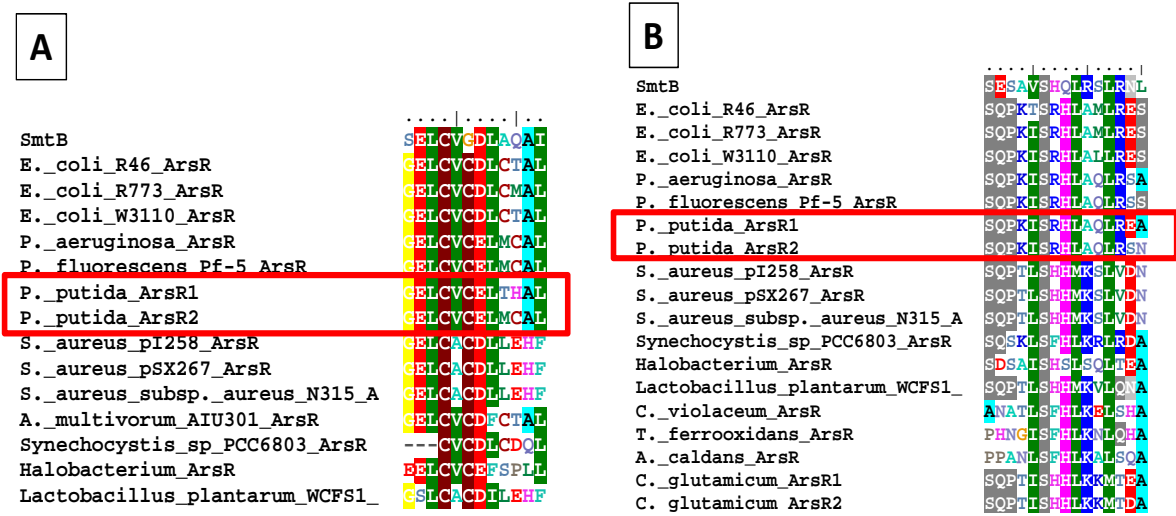
Después del análisis se descarta la regulación de estas proteínas en otros lugares del genoma y se abre la posibilidad de una regulación cruzada entre ambos sistemas.

## 2. Proteínas reguladoras ArsR1 y ArsR2

### 2.1. Secuencias. Dominios conservados

Las secuencias de las proteínas ArsR1 y ArsR2 de *P. putida* KT2440 se obtuvieron de la base de datos *Pseudomonas Genome Database* (<http://www.pseudomonas.com/>). Utilizando la aplicación *BioEdit* se pudieron alinear los motivos de unión a As(III) y a ADN de ArsR1 y ArsR2 respecto a las de otros organismos descritos previamente. En la

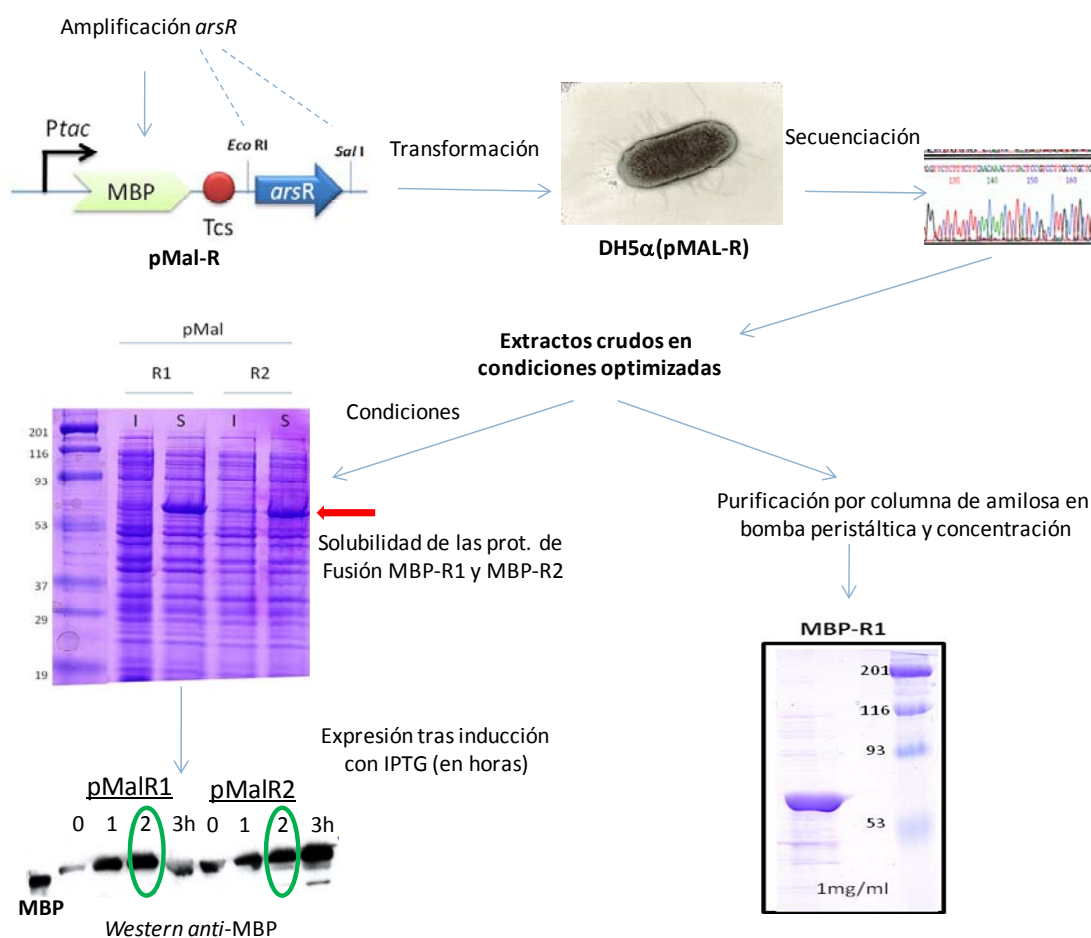
**Fig. 42** se puede observar cómo los dos sitios están perfectamente conservados en ambas proteínas de *P. putida* KT2440.



**Fig. 42.** Sitios conservados de ArsR1 y ArsR2 de *P. putida* KT2440. En **(A)** se representan los aminoácidos de la proteína de unión específica a As(III). **(B)** representa la región conservada de unión a ADN.

## 2.2. Purificación de las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2

La purificación de las proteínas reguladoras ArsR1 y ArsR2, se llevó a cabo utilizando el vector de clonación pMAL-C2T, siguiendo las recomendaciones del fabricante (*New England Biolabs*, Cat. #E8000S). Este sistema proporciona un método de expresión y purificación basado en la clonación de la proteína de interés fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP). La proteína MBP es el producto de la expresión del gen *malE* de *E. coli*, la cual ayuda a la solubilidad de la proteína fusionada en cuestión. En la **Fig. 43** podemos observar las principales etapas en la purificación de ambas proteínas. Los detalles se indican en los puntos 8.1, 8.2 y 8.3 del apartado Materiales y Métodos. Se obtuvieron, por tanto, las proteínas MBP-R1 y MBP-R2 utilizadas en los siguientes puntos.



**Fig. 43. Principales etapas en la obtención de las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2.** Se amplificaron por PCR ambos reguladores con los oligos oFWDR1-fus y oRVSR1-fus en el caso de *arsR1* y oFWDR2-fus y oRVSR2-fus para *arsR2*. Estos fragmentos se clonaron en el vector pMAL-C2T, obteniendo los vectores pMAL-R1 y pMAL-R2, respectivamente, que fueron introducidos en DH5α mediante transformación. Se estimaron las condiciones óptimas de cultivo que permitían la solubilidad de las proteínas de fusión (detalle en el punto 8.2 del apartado Materiales y Métodos), así como del tiempo necesario de inducción de las mismas (2 h en ambos casos fue suficiente). Las fusiones fueron purificadas por la afinidad de la MBP a la amilosa de la columna utilizada, quedando retenidas en la misma. Se eluyeron utilizando una solución de maltosa al 10 %. Por último, se concentraron las muestras para su posterior uso en distintos experimentos.

**2.2.1. Conformación nativa de las proteínas reguladoras de los operones *ars*: ArsR1 y ArsR2.** Debido a que los reguladores transcripcionales ArsR siempre han sido descritos como proteínas represoras con conformación dimérica (Xu *et al.*, 1998) se pretendió comprobar los posibles estados distintos de oligomerización de ArsR1 y ArsR2 de *P. putida* KT2440 mediante ultracentrifugación analítica. Se utilizaron las proteínas de fusión MBP-R1 y MBP-R2 en dichos experimentos.

**Ensayos de ultracentrifugación analítica.** Con objeto de identificar la masa molecular de los posibles multímeros de MBP-R1 y MBP-R2 se realizó un análisis mediante ultracentrifugación analítica de equilibrio de sedimentación, cuyo resultado no está influenciado por la forma de la macromolécula sometida a estudio. La **Tabla 10** muestra las masas moleculares promedio obtenidas a 9 Krpm. Estos datos son compatibles con un dímero mayoritario de aprox. 106600 Da y porcentajes variables de otras especies de mayor peso molecular. Hay que tener en cuenta que la MBP es una proteína que no dimeriza por sí sola y que los monómeros esperados para las fusiones MBP-R1 y MBP-R2 serían de 53400 Da y 53113 Da, respectivamente.

	- AsIII	+ AsIII
MBP-R1	183000 Da	186000 Da
MBP-R2	149000 Da	154000 Da

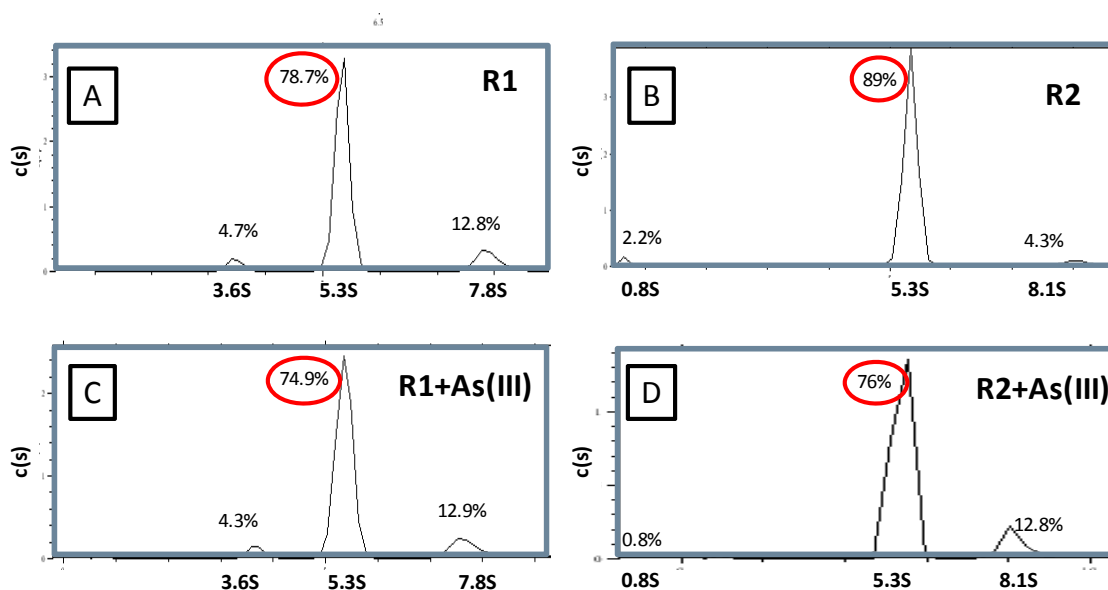
**Tabla 10. Equilibrio de Sedimentación de las proteínas de fusión.**

Masas moleculares promedio de las fusiones MBP-R1 y MBP-R2 en presencia y ausencia de inductor (arsenito)

El análisis mediante velocidad de sedimentación también mostró que los dímeros eran claramente las especies mayoritarias presentes en la disolución, en las condiciones del ensayo, a una concentración de las proteínas de 1 mg/ml (**Fig. 44**). Además, se pudo comprobar que las conformaciones de las proteínas de fusión no se veían afectadas por la presencia de la molécula inductora del operón *ars*, el arsenito. Se realizaron todos los experimentos en presencia y ausencia de As(III) y en ningún caso se apreció una variación significativa en la distribución conformacional.

La distribución de coeficientes de sedimentación (**Fig. 44**) muestra como la gran mayoría de MBP-R1 y MBP-R2, tanto en presencia como en ausencia de inductor, sedimenta como una especie molecular con un coeficiente de sedimentación de 5.3 S, compatible con un dímero de la proteína.





**Fig. 44. Velocidad de sedimentación. Distribución continua de concentraciones representada frente al coeficiente de sedimentación.** Se representa a la proteína de fusión MBP-R1 y a MBP-R2 en (A) y (B), respectivamente. Los paneles (C) y (D) representan a MBP-R1 y MBP-R2, en cada caso, incubadas en presencia de As(III). Las velocidades y condiciones empleadas en los ensayos se detallan en el punto 8.7 del apartado Materiales y Métodos. En círculos rojos se representan los porcentajes correspondientes a los dímeros de las proteínas.

### 3. Reguladores transcripcionales ArsR de *P. putida* KT2440

Para explicar el efecto que tienen las proteínas ArsR de *P. putida* KT2440 sobre los operones *ars* correspondientes, se hicieron delecciones precisas en cada regulador como se describe en los puntos 6.5.2 y 6.5.3 del apartado Materiales y Métodos. Para el análisis de los fenotipos de los mutantes, las cepas se agruparon en 3 conjuntos (i) por un lado se estudió el comportamiento de cada uno de los mutantes simples ( $\Delta$ R1,  $\Delta$ R2) y doble ( $\Delta$ R1 $\Delta$ R2) respecto de la cepa silvestre TEC1, por otro (ii) se analizó cada mutante individual complementado [ $\Delta$ R1 (pVR1) y  $\Delta$ R2 (pVR2)] respecto a su control con el vector vacío [ $\Delta$ R1 (pVLT33),  $\Delta$ R2 (pVLT33)] y (iii) por último se investigó el papel de las cepas dobles mutantes complementadas individualmente con cada uno de los reguladores [ $\Delta$ R1 $\Delta$ R2 (pVR1) y  $\Delta$ R1 $\Delta$ R2 (pVR2)] utilizando a  $\Delta$ R1 $\Delta$ R2 (pVLT33) como cepa control.

De este modo, con el fin de poder determinar la función de cada uno de los genes reguladores, se realizaron 2 experimentos diferentes de resistencia para cada uno de los grupos de cepas descritos anteriormente, **1)** frente arsenito, para determinar de

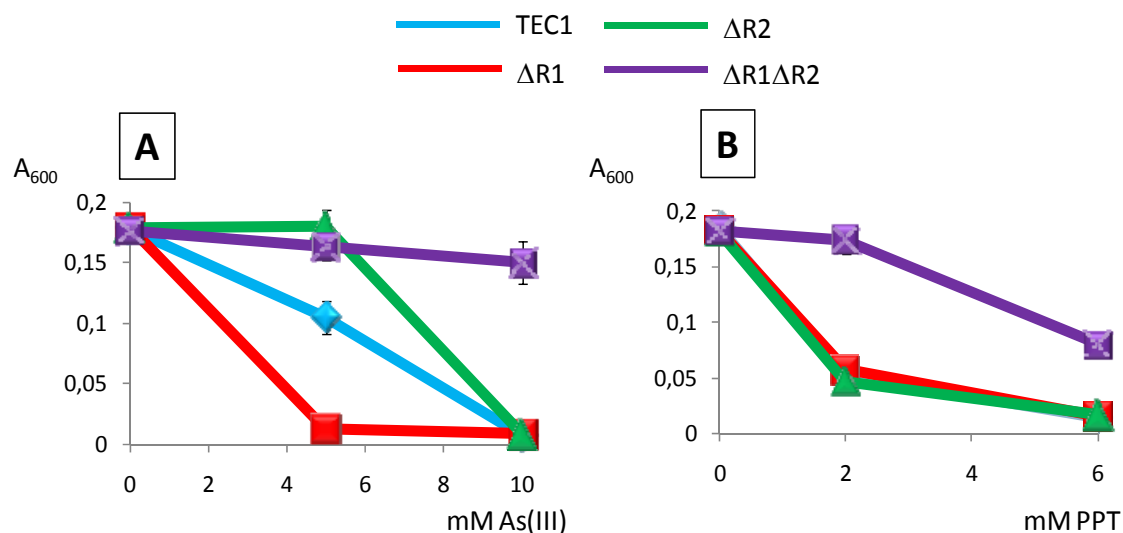
manera directa el papel de cada regulador ante el metaloide y **2)** frente a PPT, para poder ver más claramente el posible entrecruzamiento de actividades, ya que la resistencia a este herbicida sólo se encuentra co-transcrita con el operón *ars1*, pudiendo así determinar la influencia del represor ArsR2 sobre el promotor *Pars1*.

Ambos ensayos, se realizaron en placas de 96 pocillos para todas las cepas y MM cit suplementado con uracilo como medio de cultivo. En los casos donde se complementaban mutantes, se añadió Km al medio de cultivo para mantener el plásmido pVLT33 o su *derivado* con los genes *arsR* e IPTG para inducir la expresión de los genes reguladores. Para el ensayo con As(III) se utilizaron diferentes concentraciones del tóxico, representándose únicamente las correspondientes a 0, 5 y 10 mM. Para el ensayo con PPT, ésta se añadió a concentraciones finales de 0, 2 y 6 mM. Los valores de resistencia fueron medidos como cambios en la  $A_{600}$  a las distintas condiciones.

**3.1. Caracterización del fenotipo de los mutantes  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$  y  $\Delta R1\Delta R2$ . Resistencia frente a As y PPT.** Como se observa en la **Fig. 45** se pudo comprobar que ambas proteínas ArsR inhiben la expresión de los operones *ars*. Por un lado, cuando se determina la resistencia frente a As(III), en las condiciones del ensayo, el doble mutante  $\Delta R1\Delta R2$  es la cepa que claramente presenta un mayor crecimiento. Esto se puede interpretar en términos de que ambos operones *ars* están desreprimidos y se aumenta así la eficiencia de los sistemas al dispararse la transcripción. Por otra parte, igual ocurre frente a la resistencia a PPT. Al no existir ninguna represión en el promotor *Pars1* (por parte de ArsR1 ni ArsR2), la cepa  $\Delta R1\Delta R2$  expresa una mejor respuesta frente a la toxicidad del herbicida. Finalmente frente a As(III), la cepa  $\Delta R1$  es notablemente más sensible que la silvestre (TEC1) y que  $\Delta R2$ . Además, en presencia de PPT, un mutante  $\Delta R1$  (que debería sobreexpresar al gen *phoN1* de resistencia a PPT), se encuentra igual de reprimido que en  $\Delta R2$  y TEC1.

Tomados en su conjunto, estos datos sugirieron una evidente regulación cruzada de la proteína ArsR2 sobre el promotor *Pars1*.

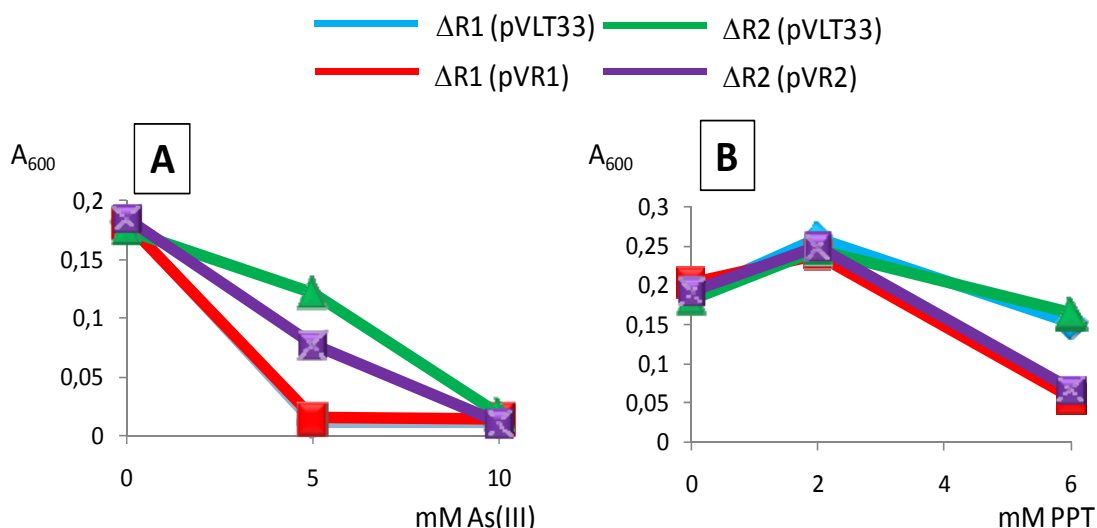
Sin embargo, no queda clara la posible interacción de ArsR1 sobre *Pars2*, ya que un mutante  $\Delta R2$  presenta una mayor resistencia que la cepa silvestre TEC1, en los ensayos frente a As(III) y, no juega ningún papel en la resistencia a PPT.



**Fig. 45.** Resistencia frente a (A) Arsénico y (B) PPT de las cepas TEC1,  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$  y  $\Delta R1\Delta R2$ . Los experimentos se realizaron por duplicado técnico y biológico a 30°C. Se representan los valores de  $A_{600}$  a las 7 horas.

### 3.2. Caracterización del fenotipo de los mutantes $\Delta R1$ y $\Delta R2$ complementados.

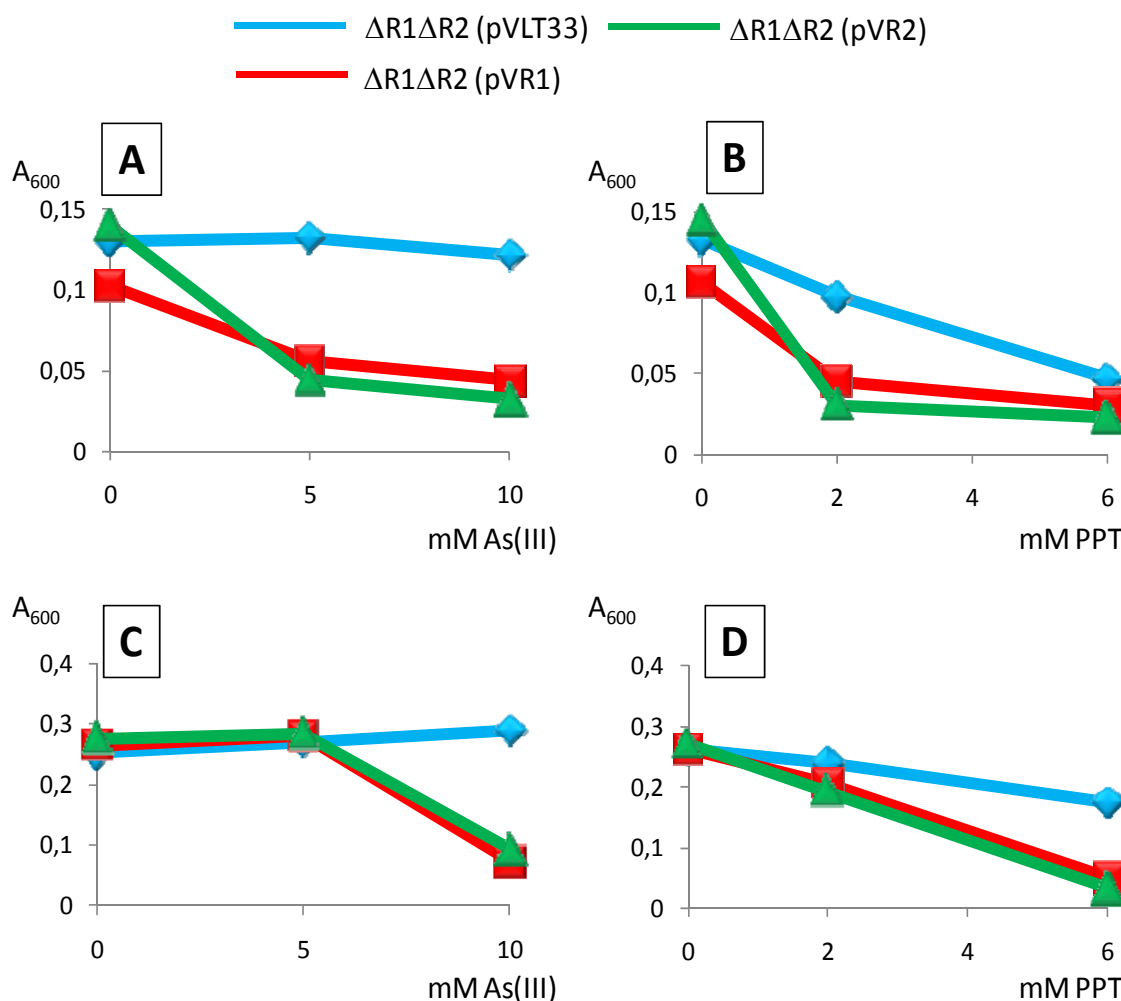
**Resistencia frente a As y PPT.** La Fig. 46 ayuda a corroborar la regulación cruzada de la proteína ArsR2 sobre el promotor *Pars1* antes propuesta. Se puede ver cómo aún eliminando el represor ArsR1 y manteniendo el vector vacío (panel A), la cepa es tan sensible a la presencia del arsenito como cuando este regulador es sobreexpresado (en rojo). Se pone así de manifiesto la actuación de ArsR2 sobre *Pars1*. En el panel B de resistencia a PPT, también podemos ver la misma característica. En el caso de la cepa mutante  $\Delta R2$  que se encuentra sobreexpresando el gen deletado *arsR2*, la resistencia al herbicida decae respecto de su control con el plásmido vacío, indicando la interacción que debe necesariamente realizar ArsR2 sobre *Pars1*.



**Fig. 46.** Resistencia frente a: (A) Arsénico y (B) PPT de las distintas cepas  $\Delta R1$  (pVLT33),  $\Delta R1$  (pVR1),  $\Delta R2$  (pVLT33) y  $\Delta R2$  (pVR2). Los experimentos se realizaron por duplicado técnico y biológico a 30°C. Se representan los valores de  $A_{600}$  a las 7 horas.

**3.3. Complementación del doble mutante  $\Delta R1\Delta R2$  con los vectores pVR1 y pVR2.** En esta ocasión fue el fondo  $\Delta R1\Delta R2$  el que se utilizó para sobreexpresar los plásmidos pVR1 y pVR2, así como el control con el plásmido vacío pVLT33 (Fig. 47). De este modo, se pudo comprobar muy claramente el papel represor de cada uno de ellos en la regulación del sistema. Se observó una mayor sensibilidad frente al arsenito (paneles A y C) por parte de las dos cepas donde se sobreexpresaba cada uno de los 2 represores transcripcionales respecto al control. Además, en el ensayo frente a PPT tanto a 7 horas como a 22 (paneles B y D, respectivamente) se vuelve a poner de manifiesto la regulación cruzada del regulador *ArsR2* sobre *Pars1*.

El gen de resistencia a PPT (*phoN1*) muestra la misma eficiencia en los casos donde se sobreexpresa *arsR1* que *arsR2*, pese a estar bajo la regulación del operón *ars1*, y por consiguiente de la proteína represora *ArsR1*.



**Fig. 47.** Resistencia de las distintas cepas  $\Delta R1\Delta R2$  (pVLT33),  $\Delta R1\Delta R2$  (pVR1) y  $\Delta R1\Delta R2$  (pVR2) a arsenito (paneles A y C) y PPT (paneles B y D). Los experimentos se realizaron por duplicado técnico y biológico a 30°C. Se representan los valores de  $A_{600}$  a las 7 horas en los paneles A y B, y a las 22 horas en C y D.

Por tanto, de todo este conjunto de análisis fenotípicos utilizando las distintas combinaciones de mutantes y complementaciones existentes se puede concluir que **1)** tanto ArsR1 como ArsR2 funcionan como inhibidores de la expresión de los operones *ars* en *P. putida* KT2440 y **2)** que ArsR2 es capaz de regular tanto al operón *ars1* como al *ars2* (*regulación cruzada*), mientras que con los experimentos realizados y en las condiciones descritas para ArsR1 sólo se pudo determinar la funcionalidad sobre *ars1*.



## **V. DISCUSIÓN**





## 1. Genes y mecanismos implicados en la hiperresistencia a As en *P. putida* KT2440

Los microorganismos han desarrollado estrategias dinámicas para enfrentar la toxicidad del arsénico en el ambiente. En este sentido, la especiación y movilidad de este metaloide se encuentra afectada por el metabolismo bacteriano, el cual participa activamente en su ciclo biogeoquímico. Aunque existen diferentes actividades microbianas capaces de alterar las características químicas del arsénico, como son la metilación-demetilación enzimática del mismo o la presencia de arsenito oxidasas y arsenato reductasas (involucradas en la respiración del arsenato) a través de proteínas asociadas a membrana capaces de transferir electrones desde/hacia el arsénico (AoxAB y ArrAB, respectivamente), es el operón *ars* el mecanismo más importante y ubicuo en la resistencia a arsénico en bacterias (Paez-Espino *et al.*, 2009).

Existen muchos tipos de configuraciones genéticas dentro de los operones de resistencia a arsénico. Como muestra la **Fig. 2**, la gran mayoría de bacterias secuenciadas presentan estos agrupamientos *ars*, y se pueden observar en ellos, todo tipo de eventos reorganizativos tomando como modelo el operón de *E. coli*. Se aprecian inserciones, deleciones, translocaciones e incluso duplicaciones del núcleo central *arsRBC*.

*P. putida* KT2440 posee 2 operones *ars* (*arsRBCH*; Canovas *et al.*, 2003), que han sido estudiados en profundidad en el presente trabajo, como únicos mecanismos de tolerancia al metaloide ya que, **(i)** cuando se realizaron cepas mutantes donde se eliminaron ambos agrupamientos genéticos se observó la hipersensibilidad de la bacteria frente a las especies químicas de As utilizadas (**Fig. 13 y Tabla 8**) descartando así la implicación de otras ORFs anotadas como ArsC en el genoma y **(ii)** por homología de secuencias no se encontraron segmentos cromosómicos similares a los descritos para otras actividades microbianas involucradas en la bioquímica del tóxico.

A través de diferentes aproximaciones bioinformáticas (alineamientos de secuencias y filogenia) se pudieron determinar las principales características de los genes centrales del operón (genes *arsRBC*) en *P. putida* KT2440. En el organismo examinado, *arsB* y *arsC* codifican respectivamente para **(i)** una bomba de expulsión de As(III) tipo ArsB, la más representada en  $\gamma$ -Proteobacterias (Rosen y Liu, 2008) y **(ii)** una arsenato

reductasa ArsC, con acoplamiento a la proteína redox tiorredoxina (**Fig. 9 y 10**, respectivamente). Utilizando estas herramientas *in silico* también se consiguió observar el alto grado de conservación de las proteínas ArsR, reguladoras de los sistemas, respecto de otros miembros de la familia SmtB/ArsR (Busenlehner *et al.*, 2003) en sus principales dominios de interés, de unión a ADN y al metal/oide (**Fig. 42**). Los miembros de dicha familia se describen siempre como homodímeros con función represora (Xu *et al.*, 1998), y en los casos descritos para el operón *ars* de *E. coli*, se presenta al As(III) como molécula efectora del sistema (Shi *et al.*, 1996). Por todo ello, nuestro primer paso en la descripción de los mecanismos de regulación fue verificar si ocurría lo mismo en *P. putida* KT2440. En la caracterización de las proteínas ArsR, la purificación de las proteínas de fusión MBP-ArsR1 y MBP-ArsR2 ayudó a clarificar la conformación nativa que adquieren *in vivo*. A través de experimentos de ultracentrifugación analítica (**Fig. 44**) se pudo determinar que ArsR1 y ArsR2 actúan como dímeros tanto en presencia como ausencia de As(III), siguiendo así la regla de conformación de la familia de reguladores transcripcionales a la que pertenecen. A través de pretratamientos con las distintas especies químicas de arsénico utilizadas en este trabajo, también se evidenció que únicamente se aumentaba la resistencia del organismo en posteriores cultivos cuando se inducía con arsenito (**Fig. 11**). Otro de los interrogantes era saber si los reguladores ArsR podrían actuar a su vez en otros genes localizados fuera de los operones *ars*. En ese sentido, se determinó que aparentemente, no existía ninguna región intergénica en el genoma de *P. putida* KT2440 con las características propias del consenso de unión a ADN de SmtB/ArsR (Busenlehner *et al.*, 2003), siendo así altamente improbable la actuación de estas proteínas en otro mecanismo celular diferente (**Fig. 41**). Sin embargo, la alta identidad entre ambos genes *arsR1* y *arsR2* de *P. putida* KT2440 (**Fig. 8**), así como de la región operadora del promotor propuesta en este trabajo (**Fig. 40**), parecía indicar la posibilidad de que existiera regulación cruzada entre los dos sistemas. Para responder a esta pregunta, aún a pesar de no contar todavía con las proteínas ArsR de *P. putida* KT2440 totalmente purificadas para realizar experimentos de regulación *in vitro*, o bien fusionadas a genes informadores, se utilizaron diferentes combinaciones de mutantes y complementaciones con los genes *arsR*. Se estudió el fenotipo obtenido de las distintas cepas delecionadas cuando se empleó As(III) y PPT como agentes tóxicos

(punto 3.1 del apartado Resultados). De este modo, se pudo ver claramente que ambas proteínas ArsR actuaban como represores de la expresión génica en *P. putida* KT2440 (**Fig. 45, 46 y 47**), ya que al eliminar estos segmentos cromosómicos la cepa se volvía más resistente al estar sobreexpresado el resto del operón *ars* de manera constitutiva. Al complementar en *trans* con cada uno de ellos, de nuevo la cepa respondía peor al As (al tener regulación negativa). El fenómeno de regulación cruzada también se dedujo, a partir de los ensayos fenotípicos anteriores, al menos de la proteína ArsR2 sobre el promotor *Pars1*, observando cómo la presencia/ausencia de la proteína reguladora incidía en los niveles de tolerancia -tanto frente a As(III) como a PPT- del mutante  $\Delta R1$  e incluso con distintas complementaciones en  $\Delta R1\Delta R2$ . No se pudo aclarar la vinculación de ArsR1 sobre *Pars2* en las condiciones ensayadas.

Por otro lado, se ha podido demostrar la funcionalidad de los genes *arsH* (integrantes del operón *ars*) de *P. putida* KT2440. La delección precisa de cada uno de los genes *arsH1* y *arsH2*, ocasionó mayor sensibilidad al microorganismo tanto frente a arsenato como a arsenito (**Fig. 23**). Además, la expresión heteróloga de estos genes en *E. coli* provocó un aumento en la resistencia de la bacteria a ambas especies químicas (**Fig. 24**). Hay que tener en cuenta que si bien, en las condiciones examinadas, el gen *arsH1* evidenció mayor importancia en la tolerancia a los iones, las temperaturas utilizadas siempre fueron las óptimas de crecimiento para cada especie, en las que el operón *ars1* mostró una mayor eficiencia (30°C en el caso de *P. putida* y 37°C para *E. coli*). Aunque no se conoce exactamente cuál es la relación de estas proteínas ArsH con la resistencia al arsénico, la reciente publicación de la estructura cristalina en *S. meliloti* (Ye *et al.*, 2007) y *S. flexneri* (Vorontsov *et al.*, 2007) ha proporcionado datos de interés para resolver la cuestión. De este modo, utilizando ensayos enzimáticos a partir de extractos celulares de los distintos mutantes realizados, hemos podido demostrar que la actividad de las proteínas fue de NADPH:FMN oxidoreductasa (**Fig. 22**). Esta actividad genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, molécula que se sabe que es capaz de oxidar las formas tóxicas As(III), MMA(III) y DMA(III) en sus respectivas formas análogas +5, menos tóxicas (Aposhian *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2007).

Un caso muy interesante fue la identificación del gen *arsN* en *P. putida* KT2440, no anotado hasta la fecha. ArsN se corresponde con una proteína similar a las glutamato

*N*-acetil transferasas y ha sido recientemente descrita a partir de una librería metagenómica de una planta de tratamiento de aguas en la India (Chauhan *et al.*, 2009). Se pudo ver, por homología de secuencias, que la región contigua en sentido divergente al operón *ars1* y anotada como intergénica se correspondía con este gen. Estudios *in silico* determinaron la región promotora de este segmento cromosómico (**Fig. 25**) y se pudo demostrar su implicación en la resistencia frente a As(V), de manera experimental, únicamente en presencia de los genes principales del operón *ars* (**Fig. 27**). El vínculo con la resistencia a As(V) por parte de ArsN podría deberse al mejor mantenimiento del balance redox durante la reducción de arsenato por parte de ArsC en *P. putida* KT2440, ya que esta actividad implica una disminución de los niveles de glutatión (GSH) y ArsN utiliza acetil-CoA como co-sustrato, reduciéndolo a la forma CoASH.

Con todo ello, se estudiaron los niveles de resistencia a arsénico por parte de *P. putida* KT2440 pudiendo determinarse, tanto en ensayos en placa como en medio líquido, su hipertolerancia a las formas arsenato y arsenito (300 y 10 mM, respectivamente), convirtiéndola en una de las cepas estudiadas hasta la fecha que soporta mayores concentraciones (**Fig. 12, Tabla 8**). Los dos operones *ars* resultaron ser funcionales (**Fig. 13**) e incluso se pudieron sobreexpresar en cepas de *E. coli* con resultados positivos (**Fig. 14**).

Por tanto, con la particularidad de mostrar dos operones *ars* en el genoma (es la única especie de *Pseudomonas* con esa característica) y poseer una elevada tolerancia al metaloide, *P. putida* KT2440 presenta unos sistemas de resistencia a arsénico que siguen fielmente los mecanismos mayoritarios establecidos en el mundo microbiano.

Pero, ¿por qué *P. putida* KT2440 posee 2 sistemas *ars* para mantener un grado de tolerancia que podría alcanzarse sólo con un único elemento? ¿Cómo se adquirió uno de los agrupamientos?

## 2. Adquisición del operón *ars1*. *Ecoparalogía* entre *ars1* y *ars2* en *P. putida* KT2440

En el afán de buscar respuesta a la presencia de 2 operones de resistencia a arsénico en *P. putida* KT2440, se estudió el entorno genético para ambos sistemas, ya que en el genoma de este organismo se han podido detectar al menos 13 transportadores de metales asociados a islas genómicas (Haritha *et al.*, 2008; Haritha *et al.*, 2009).

Pudo comprobarse (**Fig. 16**) que el operón *ars1* se encuentra en una zona con características atípicas del genoma respecto al contenido en GC y al IAC (Weinel *et al.*, 2002). Dicha región, de 62 kb de longitud, se encuentra interrumpiendo el gen esencial *tmk* (perfectamente conservado en otras cepas de *P. putida*), y presenta diferentes elementos móviles (como recombinasas específicas e integrasas de fagos) que evidencian un evento de transferencia horizontal para este segmento (**Tabla 12**, ANEXO I).

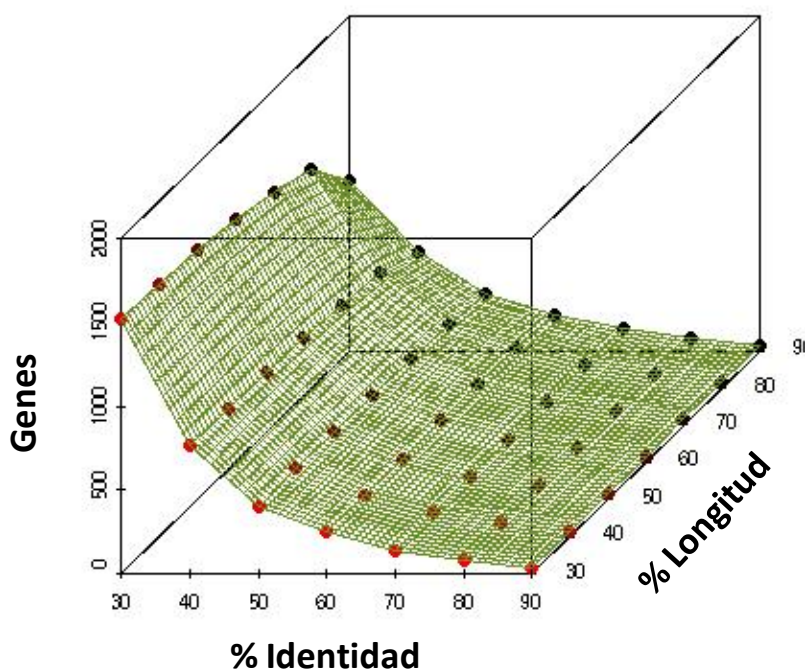
La redundancia genética, como se describió en el punto 2 de la Introducción, suele estar asociada a 3 fenómenos principales; **(i)** duplicación génica, **(ii)** paralogía y **(iii)** *ecoparalogía*, en función de la necesidad que presente una cepa determinada de aumentar la cantidad de una proteína, de la presencia de nuevas funciones a través de la divergencia, o bien de adaptarse a cambios ambientales, respectivamente (Sanchez-Perez *et al.*, 2008).

En procariotas, la mayor contribución al origen de los genes de una especie proviene de la evolución de secuencias parálogas, por duplicación y posterior diferenciación de las mismas (Gogarten *et al.*, 2002). En este sentido, aproximadamente el 30 % de los 5420 ORF's anotados en el genoma de *P. putida* KT2440 son parálogos si se considera un porcentaje de identidad de secuencia del 30 % y un alineamiento de los segmentos de al menos un 70 % en longitud (**Fig. 48**). Este fenómeno tan acentuado podría incluso llegar a causar cierto grado de inestabilidad genómica.

Pero, para el caso de los operones *ars*, el fenómeno que mejor respondería a la coexistencia de los 2 segmentos cromosómicos sería la *ecoparalogía*. Este concepto se aplica a 2 ó más copias de los genes afectados por variaciones ambientales y donde cada uno actúa desempeñando la misma función bajo distintas condiciones (Sanchez-

Perez *et al.*, 2008), ya que presentan (i) una elevada identidad de secuencia (**Fig. 8**) y (ii) la misma función.

Tras estudiar la respuesta a arsénico de *P. putida* KT2440 y utilizando 2 de los diferentes estreses más importantes a los que las bacterias se encuentran sometidas en el ambiente, como son; la salinidad y la  $T^a$  (Badger y Miller, 1995; Fornig *et al.*, 2000; Sanchez-Perez *et al.*, 2008), se pudo observar claramente que éste último es el factor clave que permite el mantenimiento de ambos operones en el genoma. De este modo, a la  $T^a$  óptima de crecimiento de *P. putida* (y superiores), el operón exógeno *ars1* presenta mayor importancia en la respuesta a arsenito. Por su parte *ars2* jugó un papel fundamental a baja  $T^a$  (15°C) tanto frente a arsenato como a arsenito (**Fig. 17**).



**Fig. 47.** Número de genes de *P. putida* KT2440 con el mismo porcentaje de identidad en base a la longitud de secuencia. Según el criterio de paralogía utilizado (30 % identidad y 70 % de longitud respecto a la secuencia más corta), existen alrededor de 1500 genes putativos parálogos en *P. putida* KT2440. Cada gen fue alineado con el resto del genoma utilizando la aplicación *Blastp*.

Un dato a tener en cuenta fue la diferencia en la transcripción de ambos operones *ecoparálogos* bajo las diversas condiciones del parámetro ecológico que los controlaba. Mientras que a baja  $T^a$  (15°C) los valores de transcrito eran mucho más

elevados para *ars2*, siendo el sistema más importante con diferencia en la respuesta a arsénico, en el caso de  $T^a$  superior (30-37°C), donde la transcripción es más equilibrada, *ars1* se mostró como un mecanismo bastante más eficiente especialmente frente a arsenito (**Fig. 18**).

El marco en el que se presenta esta parte del trabajo realizado podría servir como base a la comprensión de la redundancia genética en la adaptación ambiental bacteriana. Actualmente, los modelos evolutivos existentes tras un evento de duplicación, indican que este acontecimiento no tiene ningún efecto en el *fitness* bacteriano (Francino, 2005), a no ser que las duplicaciones conlleven nuevas funciones que puedan ser seleccionadas de manera positiva desde su inicio. El desarrollo de la nueva función comenzaría con la amplificación de los genes con un cierto nivel de preadaptation para la labor determinada, seguida por un período de evolución competitiva entre las copias génicas, lo que resultaría en el mantenimiento de la variante más eficaz, la *pseudogenización* y la eventual pérdida del resto (Francino, 2005).

El ejemplo que describimos en el presente trabajo, caracterizado experimentalmente en *P. putida* KT2440, presentó el mantenimiento de ambos mecanismos *ars* de resistencia a arsénico como sistemas *ecoparálogos*, con diferentes patrones de expresión y eficiencia, ante diferentes  $T^a$ 's.

### **3. Regulación de la resistencia al herbicida PPT. Diferencias entre los mecanismos de tolerancia a PPT y MetSox en *P. putida* KT2440**

En el estudio del entorno genético del operón *ars1* de *P. putida* KT2440 se pudo detectar la presencia de 3 genes adyacentes al sistema que, debido a su orientación y al nulo espacio intergénico que existía entre ellos (Fig. 28), podrían co-expresarse con los otros genes *ars*. Dichos genes se encontraban anotados en las bases de datos del genoma como putativos y codificaban para; una monooxigenasa (*arsO*), una proteína de la familia de las fosfatasas y una PPT-*N*-acetil transferasa (**Tabla 9**). Aún siendo *arsO* un gen potencialmente interesante, descrito como integrante del operón *ars* de *Streptomyces* sp. (Wang *et al.*, 2006), la aparente ausencia de funcionalidad en este

organismo llevó a centrar la atención en la proteína PPT-*N* acetil transferasa, ya que el producto que detoxifica, la PPT, es el ingrediente activo de numerosos herbicidas de interés comercial (Schwartz *et al.*, 2004) y un marcador de selección para gran cantidad de plantas transgénicas (Lutz *et al.*, 2001).

Se sabía que *P. putida* KT2440 es un organismo con elevada capacidad para resistir a la PPT de forma natural, soportando concentraciones de aproximadamente 3 mM, mientras que en el suelo no se suelen encontrar niveles superiores a 1 mM (Ahmad, 1995; Pampulha *et al.*, 2007). A través de la búsqueda *in silico* en el genoma de esta bacteria, dichos niveles de resistencia se adjudicaron, en un principio, a la presencia del gen *phoN1* (PPT-*N*-acetil transferasa putativa, adyacente al operón *ars1*) y *phoN2* (PPT-*N*-acetil transferasa localizada en otro lugar cromosómico). Sorprendentemente, el microorganismo presentaba la misma resistencia al tóxico si se eliminaba uno de los elementos o incluso los dos.

Como respuesta a la alta resistencia de *P. putida* KT2440 frente a PPT del doble mutante  $\Delta phoN1\Delta phoN2$ , hay que decir que la actividad *N*-acetil transferasa no es la única que existe en este organismo ante el herbicida. Además se han podido describir varias transaminasas en *P. putida* capaces que convertir PPT en PPO en el proceso de detoxificación (Ramos *et al.*, 1991), aunque los genes correspondientes no han sido aún asignados.

Respecto a los genes individuales se pudo comprobar que la actividad de *phoN1* estaba sujeta a la presencia de As(III) en el medio ya que, cuando se presentaban concentraciones del metaloide, subinhibitorias para *P. putida* KT2440 (1 mM), la cepa era capaz de alcanzar niveles de tolerancia a PPT muy elevados (**Fig. 30**). Se demostró que el mecanismo de acción de la proteína PhoN1 era la conversión de PPT en su derivado acetilado (*N*-acetil PPT) a través de ensayos enzimáticos *in vitro* (**Fig. 36**).

Para el caso de *phoN2*, la búsqueda bibliográfica y el análisis filogenético llevó a asociarlo con los genes PA\_4866 y ACIAD1637 de *P. aeruginosa* y *A. baylyi* ADP1, respectivamente (Davies *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2009). Las proteínas que codifican en estos microorganismos, aún estando cristalizadas y anotadas como PPT-*N*-acetil transferasas, no tienen como sustrato a la PPT sino a la MetSox. Se realizaron



diferentes experimentos frente a ambos tóxicos en *P. putida* KT2440 utilizando los distintos mutantes de delección *phoN1* y *phoN2* (con y sin complementar) y, efectivamente, se pudo comprobar la diferenciación del sustrato a utilizar por parte de las dos proteínas que aparentemente son tan parecidas (**Fig. 34, 35**). Lo mismo ocurriría cuando se complementaba a *E. coli* con los genes correspondientes (**Fig. 39**). Resulta bastante intrigante por qué cada una de las proteínas es incapaz de reconocer al otro de los sustratos, siendo éstos prácticamente iguales a nivel de estructura, química y función, ambos inhiben la GS (Gill y Eisenberg, 2001). La única diferencia entre los dos compuestos estriba en que mientras en MetSox se presenta un átomo de azufre y un nitrógeno protonado, la PPT contiene un fósforo y un grupo hidroxilo. Sin embargo, cuando se revisa el centro activo de ambas proteínas se observa que para el caso de *phoN1* no se encuentran conservados los residuos clave identificados en la interacción con MetSox (**Fig. 37**), siendo mucho más parecido al centro activo de *Streptomyces* (que posee verdadera actividad PPT-*N*-acetil transferasa) e idéntico al que presenta *P. syringae* en configuración *arsRBCHphoN1*. Esta diferencia en el lugar de interacción del sustrato parece ser la clave de que ambas proteínas pertenezcan a la misma familia de enzimas pero con sustratos no idénticos.

Pero más allá de los diferentes mecanismos de resistencia que muestra *P. putida* KT2440 ante estas moléculas herbicidas, se encuentra el hecho de que el gen *phoN1* presente una regulación dependiente de la presencia de arsénico, un contaminante ambiental.

Como otro ejemplo hay que mencionar que, en trabajos previos, también se ha descrito la presencia de arsénico como un agente capaz de co-activar la expresión de genes catabólicos de la biodegradación de *m*-xileno a través del plásmido TOL (pWW0) de *P. putida* (Velazquez *et al.*, 2006), desconociendo el modo de acción. Por tanto podría decirse que el As ambiental no sólo constituye un agente perjudicial/tóxico para *P. putida* KT2440, sino que además podría considerarse como una señal de especificidad de nicho. De este modo, *P. putida* KT2440 podría haber desarrollado la capacidad de utilizar el As del medio como un indicio ambiental en la regulación de la expresión de varios genes no relacionados aparentemente con su toxicidad.

La capacidad de *P. putida* KT2440 (y seguramente de otras bacterias) para soportar la exposición a metales pesados y metaloides debe ser entendida, por tanto, desde una perspectiva más amplia y un punto de vista evolutivo, es decir, desde la capacidad que poseen los microorganismos de ajustar los diferentes mecanismos de respuesta ante los tóxicos y de asociar señales ambientales a respuestas relacionadas con otras redes reguladoras.

Estamos convencidos de que este trabajo aporta un conjunto considerable de nuevos datos sobre la resistencia a arsénico en las bacterias del suelo y su significado ecológico. En particular, **(i)** la identificación de los operones *ars* como sistemas *ecoparálogos* y **(ii)** la regulación subrogada de la resistencia a PPT por la presencia de arsénico, son resultados inesperados que amplían el valor funcional de estos genes y sus mecanismos de expresión.

## **VI. CONCLUSIONES**



El trabajo descrito a lo largo de esta Tesis ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. *P. putida* KT2440 posee 2 operones *ars* como únicos mecanismos de resistencia a arsénico, localizados en distintas regiones del genoma, inducibles por As(III) y constituidos por: un regulador transcripcional (*arsR*), una bomba de extrusión de arsenito (tipo *ArsB*), una arsenato reductasa dependiente de tiorredoxina (*ArsC*) y una proteína de óxido-reducción NADPH:FMN (*ArsH*). Asimismo el operón *ars1* de *P. putida* KT2440 lleva asociados 3 genes más (una monooxigenasa, una fosfatasa y una PPT-N-acetil transferasa) regulados por *arsR* desde el promotor *Pars<sub>1</sub>*.
2. La adquisición del operón *ars1* de *P. putida* KT2440 se debe a un proceso de transferencia horizontal.
3. Los operones *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 son *ecoparálogos*, siendo la temperatura el factor determinante para su coexistencia en la bacteria. A la temperatura óptima de crecimiento (y superiores), entre 30-37°C, *ars1* otorga mayor resistencia a arsénico al microorganismo (especialmente frente a arsenito). El operón *ars2* mostró ser mucho más importante a temperaturas menores (15°C), existiendo en ambos casos, diferencias en la transcripción entre los dos segmentos cromosómicos, que además son funcionales en *E. coli*.
4. *P. putida* KT2440 presenta una elevada resistencia a arsénico en sus formas inorgánicas arsenato (hasta 300 mM) y arsenito (hasta 10 mM), siendo una de las bacterias más tolerantes descritas a día de hoy.
5. *P. putida* KT2440 posee otros genes involucrados en la resistencia a arsénico como complemento al núcleo central *arsRBC* (que debe estar siempre presente). Éstos son, *arsH1* y *arsH2* (constituyentes de los operones *ars*) capaces de otorgar mayor resistencia tanto frente a arsenato como a arsenito, y el nuevo gen descrito *arsN* (transcrito de manera divergente al operón *ars1*) que ayuda a la resistencia a arsenato en la bacteria. Los tres genes, además son funcionales en cepas de *E. coli arsRBC<sup>+</sup>*.

## CONCLUSIONES

**6.** El genoma de *P. putida* KT2440 contiene 2 genes similares anotados como *phoN1* (subrogado al operón *ars1*) y *phoN2*, pertenecientes a familias diferentes, involucrados en la resistencia a PPT (por *N*-acetilación de la misma) y a MetSox, respectivamente. Ambos genes confieren las mismas resistencias en cepas de *E. coli*.

**7.** La conformación nativa de las proteínas reguladoras ArsR1 y ArsR2 de los operones *ars* de *P. putida* KT2440 es dimérica. Ambos reguladores presentan aparentemente una elevada afinidad de unión a las zonas operadoras correspondientes y actúan como represores de la expresión de los operones *ars*, existiendo al menos, regulación cruzada entre ArsR2 y *Pars*<sub>1</sub>.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





- Achour, A.R., Bauda, P., y Billard, P. (2007) Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol* **158**: 128-137.
- Afkar, E., Lisak, J., Saltikov, C., Basu, P., Oremland, R.S., y Stolz, J.F. (2003) The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 107-112.
- Ahmad, I.a.M., D. (1995) Interaction of soil microflora with the herbicide phosphinothricin. *Agric. Ecosyst. Environ.* **54**: 165-174.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Avram, M.D., Sampayo-Reyes, A., y Wollenberg, M.L. (2004) A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**: 327-335.
- Appelo, C.A., Van Der Weiden, M.J., Tournassat, C., y Charlet, L. (2002) Surface complexation of ferrous iron and carbonate on ferrihydrite and the mobilization of arsenic. *Environ Sci Technol* **36**: 3096-3103.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., y Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201.
- Bachmann, B.J. (1987) Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. F. C. Neidhardt, J.L.I., K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, y H. E. Umbarger (ed). Washington, D.C: American Society for Microbiology, pp. 1190-1219.
- Badger, J.L., y Miller, V.L. (1995) Role of RpoS in survival of *Yersinia enterocolitica* to a variety of environmental stresses. *J Bacteriol* **177**: 5370-5373.
- Bartsch, K., y Tebbe, C.C. (1989) Initial Steps in the Degradation of Phosphinothricin (Glufosinate) by Soil Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **55**: 711-716.
- Bayer, E., Gugel, K.H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., Konig, W.A., y Zahner, H. (1972) Metabolic products of microorganisms. 98. Phosphinothricin and phosphinothricyl-alanyl-analine. *Helv Chim Acta* **55**: 224-239.
- Bentley, R., y Chasteen, T.G. (2002) Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 250-271.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Busenlehner, L.S., Pennella, M.A., y Giedroc, D.P. (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 131-143.
- Butcher, B.G., Deane, S.M., y Rawlings, D.E. (2000) The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1826-1833.

- Cai, J., Salmon, K., y DuBow, M.S. (1998) A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology* **144**: 2705-2713.
- Calanduoni, J.A., y Villafranca, J.J. (1986) Inhibition of *Escherichia coli* glutamine synthetase by phosphinothricin. *Bioorg. Chem.* **14**: 163-169.
- Canovas, D., Cases, I., y de Lorenzo, V. (2003) Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* **5**: 1242-1256.
- Carlin, A., Shi, W., Dey, S., y Rosen, B.P. (1995) The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J Bacteriol* **177**: 981-986.
- Challenger, F. (1951) Biological methylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **12**: 429-491.
- Chatelier, R.C. (1988) A parameterized overspeeding method for the rapid attainment of low-speed sedimentation equilibrium. *Anal Biochem* **175**: 114-119.
- Chauhan, N.S., Ranjan, R., Purohit, H.J., Kalia, V.C., y Sharma, R. (2009) Identification of genes conferring arsenic resistance to *Escherichia coli* from an effluent treatment plant sludge metagenomic library. *FEMS Microbiol Ecol* **67**: 130-139.
- Chevrier, B., Moras, D., Jeannoda, V. L. R., Creppy E. E., y Dirheimer G. (1986) Absolute configuration of natural methionine sulfoximine. *Acta Cryst* **C42**: 1632-1634.
- Choi, K.H., Kumar, A., y Schweizer, H.P. (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**: 391-397.
- Daubin, V., Lerat, E., y Perriere, G. (2003) The source of laterally transferred genes in bacterial genomes. *Genome Biol* **4**: R57.
- Davies, A.M., Tata, R., Bevil, R.L., Sutton, B.J., y Brown, P.R. (2007) L-Methionine sulfoximine, but not phosphinothricin, is a substrate for an acetyltransferase (gene PA4866) from *Pseudomonas aeruginosa*: structural and functional studies. *Biochemistry* **46**: 1829-1839.
- Davies, A.M., Tata, R., Snape, A., Sutton, B.J., y Brown, P.R. (2009) Structure and substrate specificity of acetyltransferase ACIAD1637 from *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Biochimie* **91**: 484-489.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., y Timmis, K.N. (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/Ptrp-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., y DuBow, M.S. (1995) An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **177**: 2050-2056.
- Dombrowski, P.M., Long, W., Farley, K.J., Mahony, J.D., Capitani, J.F., y Di Toro, D.M. (2005) Thermodynamic analysis of arsenic methylation. *Environ Sci Technol* **39**: 2169-2176.
- Eguchi, N., Kuroda, K., y Endo, G. (1997) Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch Environ Contam Toxicol* **32**: 141-145.
- Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R., y Kuhn, P. (2001) Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* **9**: 125-132.
- Filer, D., y Furano, A.V. (1981) Duplication of the *tuf* gene, which encodes peptide

- chain elongation factor Tu, is widespread in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **148**: 1006-1011.
- Forng, R.Y., Champagne, C., Simpson, W., y Genco, C.A. (2000) Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Dis* **6**: 351-365.
- Francino, M.P. (2005) An adaptive radiation model for the origin of new gene functions. *Nat Genet* **37**: 573-577.
- Galvao, T.C., y de Lorenzo, V. (2005) Adaptation of the yeast URA3 selection system to gram-negative bacteria and generation of a  $\Delta betCDE$  *Pseudomonas putida* strain. *Appl Environ Microbiol* **71**: 883-892.
- Gihring, T.M., y Banfield, J.F. (2001) Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 335-340.
- Gihring, T.M., Druschel, G.K., McCleskey, R.B., Hamers, R.J., y Banfield, J.F. (2001) Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. *Environ Sci Technol* **35**: 3857-3862.
- Gill, H.S., y Eisenberg, D. (2001) The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition. *Biochemistry* **40**: 1903-1912.
- Gogarten, J.P., y Olendzenski, L. (1999) Orthologs, paralogs and genome comparisons. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 630-636.
- Gogarten, J.P., Doolittle, W.F., y Lawrence, J.G. (2002) Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol Biol Evol* **19**: 2226-2238.
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M. *et al.* (2004) Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**: 31010-31017.
- Griffith, O.W., y Meister, A. (1978) Differential inhibition of glutamine and gamma-glutamylcysteine synthetases by alpha-alkyl analogs of methionine sulfoximine that induce convulsions. *J Biol Chem* **253**: 2333-2338.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Haritha, A., Rodrigue, A., y Mohan, P.M. (2008) A comparative analysis of metal transportomes from metabolically versatile *Pseudomonas*. *BMC Res Notes* **1**: 88.
- Haritha, A., Sagar, K.P., Tiwari, A., Kiranmayi, P., Rodrigue, A., Mohan, P.M., y Singh, S.S. (2009) MrdH, a novel metal resistance determinant of *Pseudomonas putida* KT2440 is flanked by metal-inducible mobile genetic elements. *J Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00465-09
- Harold, F.M., y Baarda, J.R. (1966) Interaction of arsenate with phosphate-transport systems in wild-type and mutant *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* **91**: 2257-2262.
- Hemond, H.F. (1995) Movement and distribution of arsenic in the Aberjona watershed. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 1**: 35-40.
- Herouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T. *et al.* (2005) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol* **41**: 134-149.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., y Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-

- antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.
- Ihmels, J., Collins, S.R., Schuldiner, M., Krogan, N.J., y Weissman, J.S. (2007) Backup without redundancy: genetic interactions reveal the cost of duplicate gene loss. *Mol Syst Biol* **3**: 86.
- Ismail, B.S., Jokha, Y. y Omar, O. (1995) Effects of glufosinate-ammonium on microbial populations and enzyme activities in soils. *Microbios* **83**: 185-190.
- Jackson, C.R., Langner, H.W., Donahoe-Christiansen, J., Inskeep, W.P., y McDermott, T.R. (2001) Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environ Microbiol* **3**: 532-542.
- Jain, R., Rivera, M.C., Moore, J.E., y Lake, J.A. (2002) Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor Popul Biol* **61**: 489-495.
- Kaise, T., Hanaoka, K., y Tagawa, S. (1985) The formation of trimethylarsine oxide from arsenobetaine by biodegradation with marine microorganisms. *Chemosphere* **16**: 2551-2558.
- Kapatai, G., Large, A., Benesch, J.L., Robinson, C.V., Carrascosa, J.L., Valpuesta, J.M. et al. (2006) All three chaperonin genes in the archaeon *Haloferax volcanii* are individually dispensable. *Mol Microbiol* **61**: 1583-1597.
- Kashyap, D.R., Botero, L.M., Franck, W.L., Hassett, D.J., y McDermott, T.R. (2006) Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **188**: 1081-1088.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., y Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
- Kibbe, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* **35**: W43-46.
- Koch, I., Feldmann, J., Wang, L., Andrewes, P., Reimer, K.J., y Cullen, W.R. (1999) Arsenic in the Meager Creek hot springs environment, British Columbia, Canada. *Sci Total Environ* **236**: 101-117.
- Koonin, E.V. (2003a) Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nat Rev Microbiol* **1**: 127-136.
- Koonin, E.V. (2003b) Horizontal gene transfer: the path to maturity. *Mol Microbiol* **50**: 725-727.
- Koonin, E.V. (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* **39**: 309-338.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., y Aravind, L. (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu Rev Microbiol* **55**: 709-742.
- Krafft, T., y Macy, J.M. (1998) Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur J Biochem* **255**: 647-653.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langner, H.W., Jackson, C.R., McDermott, T.R., y Inskeep, W.P. (2001) Rapid oxidation of arsenite in a hot spring ecosystem, Yellowstone National Park. *Environ Sci Technol* **35**: 3302-3309.
- Laue, T.M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., y Pelletier, S. L. (1992) *In Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Cambridge: Royal Society

- of Chemistry.
- Leist, M., Casey, R.J., y Caridi, D. (2000) The management of arsenic wastes: problems and prospects. *J Hazard Mater* **76**: 125-138.
- Lerat, E., y Ochman, H. (2005) Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **33**: 3125-3132.
- Lercher, M.J., y Pal, C. (2008) Integration of horizontally transferred genes into regulatory interaction networks takes many million years. *Mol Biol Evol* **25**: 559-567.
- Letunic, I., Doerks, T., y Bork, P. (2009) SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **37**: D229-232.
- Lin, Y.F., Yang, J., y Rosen, B.P. (2007) ArsD: an As(III) metallochaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **39**: 453-458.
- Liu, Z., Boles, E., y Rosen, B.P. (2004) Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 17312-17318.
- Liu, Z., Sanchez, M.A., Jiang, X., Boles, E., Landfear, S.M., y Rosen, B.P. (2006) Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochem Biophys Res Commun* **351**: 424-430.
- Lutz KA, Knapp JE, y Maliga P. (2001) Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol* **125**:1585-90.
- Macur, R.E., Wheeler, J.T., McDermott, T.R., y Inskeep, W.P. (2001) Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environ Sci Technol* **35**: 3676-3682.
- Macy, J.M., Santini, J.M., Pauling, B.V., O'Neill, A.H., y Sly, L.I. (2000) Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch Microbiol* **173**: 49-57.
- Macy, J.M., Nunan, K., Hagen, K.D., Dixon, D.R., Harbour, P.J., Cahill, M., y Sly, L.I. (1996) *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 1153-1157.
- Manoil, C., y Beckwith, J. (1985) *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8129-8133.
- Marek, E.T., y Dickson, R.C. (1987) Cloning and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes that confer L-methionine sulfoximine and tabtoxin resistance. *J Bacteriol* **169**: 2440-2448.
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J., y Kligerman, A.D. (2001) Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem Res Toxicol* **14**: 355-361.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., y Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**: 911-940.
- Maughan, S.C., y Cobbett, C.S. (2003) Methionine sulfoximine, an alternative selection for the *bar* marker in plants. *J Biotechnol* **102**: 125-128.
- Meister, A., Krishnaswamy, P.R., y Pamiljans, V. (1962) Mechanism of glutamic acid activation and glutamine synthesis. *Fed Proc* **21**: 1013-1022.
- Meng, Y.L., Liu, Z., y Rosen, B.P. (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 18334-18341.
- Messens, J., y Silver, S. (2006) Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol* **362**: 1-17.
- Michalke, K., Wickenheiser, E.B., Mehring, M., Hirner, A.V., y Hensel, R. (2000)

- Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2791-2796.
- Minton, A.P. (1994) *In Modern Analytical Ultracentrifugation*. Boston (MA): Birkhäuser.
- Mira, A., Pushker, R., y Rodríguez-Valera, F. (2006) The Neolithic revolution of bacterial genomes. *Trends Microbiol* **14**: 200-206.
- Moore, L.E., Smith, A.H., Eng, C., Kalman, D., DeVries, S., Bhargava, V. *et al.* (2002) Arsenic-related chromosomal alterations in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**: 1688-1696.
- Moore, M.M., Harrington-Brock, K., y Doerr, C.L. (1997) Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat Res* **386**: 279-290.
- Moran, S., Maturana, G., Rosenberg, H., Casanegra, P., y Dubernet, J. (1977) Coronary occlusions associated with chronic arsenic poisoning. Apropos of 2 operated cases. *Arch Mal Coeur Vaiss* **70**: 1115-1120.
- Muller, D., Lievreumont, D., Simeonova, D.D., Hubert, J.C., y Lett, M.C. (2003) Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. *J Bacteriol* **185**: 135-141.
- Murray, M.G., y Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325.
- Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., y Gojobori, T. (2004) Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat Genet* **36**: 760-766.
- Nelson, K.E., Weinelt, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A. *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Newman, D.K., Beveridge, T.J., y Morel, F. (1997a) Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2022-2028.
- Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovley, D.R., y Morel, F.M. (1997b) Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch Microbiol* **168**: 380-388.
- Nordstrom, D.K. (2002) Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* **296**: 2143-2145.
- Notti, A., Fattorini, D., Razzetti, E.M., y Regoli, F. (2007) Bioaccumulation and biotransformation of arsenic in the Mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*: experimental observations. *Environ Toxicol Chem* **26**: 1186-1191.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., y Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Oremland, R.S., y Stolz, J.F. (2003) The ecology of arsenic. *Science* **300**: 939-944.
- Oremland, R.S., y Stolz, J.F. (2005) Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol* **13**: 45-49.
- Oremland, R.S., Hoefft, S.E., Santini, J.M., Bano, N., Hollibaugh, R.A., y Hollibaugh, J.T. (2002) Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4795-4802.
- Otte, M.L., Kearns, C.C., y Doyle, M.O. (1995) Accumulation of arsenic and zinc in the rhizosphere of wetland plants. *Bull Environ Contam Toxicol* **55**: 154-161.
- Páez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V., y Canovas, D. (2009) Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* **22**: 117-130.
- Pampulha, M.E., Ferreira, M.A., y Oliveira, A. (2007) Effects of a phosphinothricin

- based herbicide on selected groups of soil microorganisms. *J Basic Microbiol* **47**: 325-331.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., y Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605-1612.
- Poitry, S., Poitry-Yamate, C., Ueberfeld, J., MacLeish, P.R., y Tsacopoulos, M. (2000) Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* **20**: 1809-1821.
- Pott, W.A., Benjamin, S.A., y Yang, R.S. (2001) Pharmacokinetics, metabolism, and carcinogenicity of arsenic. *Rev Environ Contam Toxicol* **169**: 165-214.
- Prithivirajasingh, S., Mishra, S.K., y Mahadevan, A. (2001a) Detection and analysis of chromosomal arsenic resistance in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1393-1401.
- Prithivirajasingh, S., Mishra, S.K., y Mahadevan, A. (2001b) Functional analysis of a chromosomal arsenic resistance operon in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. *Mol Biol Rep* **28**: 63-72.
- Pushker, R., Mira, A., y Rodriguez-Valera, F. (2004) Comparative genomics of gene-family size in closely related bacteria. *Genome Biol* **5**: R27.
- Qin, J., Rosen, B.P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S., y Rensing, C. (2006) Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2075-2080.
- Quinn, J.P., y McMullan, G. (1995) Carbon-arsenic bond cleavage by a newly isolated gram-negative bacterium, strain ASV2. *Microbiology* **141**: 721-725.
- Raes, J., y Van de Peer, Y. (2003) Gene duplication, the evolution of novel gene functions, and detecting functional divergence of duplicates *in silico*. *Appl Bioinformatics* **2**: 91-101.
- Ramirez-Solis, A., Mukopadhyay, R., Rosen, B.P., y Stemmler, T.L. (2004) Experimental and theoretical characterization of arsenite in water: insights into the coordination environment of As-O. *Inorg Chem* **43**: 2954-2959.
- Ramos, J.L., Duque, E., y Ramos-Gonzalez, M.I. (1991) Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl Environ Microbiol* **57**: 260-266.
- Ridley, W.P., Dizikes, L., Cheh, A., y Wood, J.M. (1977) Recent studies on biomethylation and demethylation of toxic elements. *Environ Health Perspect* **19**: 43-46.
- Rosen, B.P. (1995) Resistance mechanisms to arsenicals and antimonials. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **6**: 251-263.
- Rosen, B.P. (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* **529**: 86-92.
- Rosen, B.P., y Liu, Z. (2008) Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ Int* **35**: 512-5.
- Rosen, P. (1971) Theoretical significance of arsenic as a carcinogen. *J Theor Biol* **32**: 425-426.
- Rowe, W.B., y Meister, A. (1970) Identification of L-methionine-S-sulfoximine as the convulsant isomer of methionine sulfoximine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**: 500-506.
- Rozen, S., y Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-386.
- Ruokolainen, M., Panssar-Kallio, M., Haapa, A., y Kairesalo, T. (2000) Leaching, runoff

- and speciation of arsenic in a laboratory mesocosm. *Sci Total Environ* **258**: 139-147.
- Sambrook, J., T. Maniatis, y T. Fritsch (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.
- Sanchez-Perez, G., Mira, A., Nyiro, G., Pasic, L., y Rodriguez-Valera, F. (2008) Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends Genet* **24**: 154-158.
- Sanchez-Sutil, M.C., Gomez-Santos, N., Moraleda-Munoz, A., Martins, L.O., Perez, J., y Munoz-Dorado, J. (2007) Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **189**: 4887-4898.
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., y Wolfson, H.J. (2005) PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res* **33**: W363-367.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**: 1606-1619.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., y Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5857-5864.
- Schwartz, D., Berger, S., Heinzelmann, E., Muschko, K., Welzel, K., y Wohlleben, W. (2004) Biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphinothricin tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7093-7102.
- Senn, D.B., y Hemond, H.F. (2002) Nitrate controls on iron and arsenic in an urban lake. *Science* **296**: 2373-2376.
- Shariatpanahi, M., Anderson, A.C., Abdelghani, A.A., Englande, A.J., Hughes, J., y Wilkinson, R.F. (1981) Biotransformation of the pesticide sodium arsenate. *J Environ Sci Health B* **16**: 35-47.
- Sharp, P.M., y Li, W.H. (1987) The codon Adaptation Index a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **15**: 1281-1295.
- Shaw, C.A., Bains, J.S., Pasqualotto, B.A., y Curry, K. (1999) Methionine sulfoximine shows excitotoxic actions in rat cortical slices. *Can J Physiol Pharmacol* **77**: 871-877.
- Shi, W., Dong, J., Scott, R.A., Ksenzenko, M.Y., y Rosen, B.P. (1996) The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the *ars* operon. *J Biol Chem* **271**: 9291-9297.
- Silver, S. (1998) Genes for all metals a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom Award Lecture. *J Ind Microbiol Biotechnol* **20**: 1-12.
- Silver, S., y Misra, T.K. (1984) Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. *Basic Life Sci* **28**: 23-46.
- Silver, S., y Phung, L.T. (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol* **71**: 599-608.
- Singh, N., Kumar, D., y Sahu, A.P. (2007) Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention. *J Environ Biol* **28**: 359-365.
- Stolz, J.F., y Oremland, R.S. (1999) Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 615-627.
- Strauch, E., Wohlleben, W., y Puhler, A. (1988) Cloning of a phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* **63**: 65-74.
- Suzuki, K., Wakao, N., Kimura, T., Sakka, K., y Ohmiya, K. (1998) Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301



- plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 411-418.
- Suzuki, K., Wakao, N., Sakurai, Y., Kimura, T., Sakka, K., y Ohmiya, K. (1997) Transformation of *Escherichia coli* with a large plasmid of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 encoding arsenic resistance. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2089-2091.
- Swank, R.T., y Munkres, K.D. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* **39**: 462-477.
- Tamaki, S., y Frankenberger, W.T., Jr. (1992) Environmental biochemistry of arsenic. *Rev Environ Contam Toxicol* **124**: 79-110.
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., y Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* **6**: 2519-2523.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- vanden Hoven, R.N., y Santini, J.M. (2004) Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim Biophys Acta* **1656**: 148-155.
- Velazquez, F., de Lorenzo, V., y Valls, M. (2006) The m-xylene biodegradation capacity of *Pseudomonas putida* mt-2 is submitted to adaptation to abiotic stresses: evidence from expression profiling of *xyl* genes. *Environ Microbiol* **8**: 591-602.
- Vorontsov, I., Minasov, G., Brunzelle, J.S., Shuvalova, L., Kiryukhina, O., Collart, F.R., y Anderson, W.F. (2007) Crystal structure of an apo form of *Shigella flexneri* ArsH protein with an NADPH-dependent FMN reductase activity. *Protein Sci* **16**: 2483-2490.
- Wang, L., Chen, S., Xiao, X., Huang, X., You, D., Zhou, X., y Deng, Z. (2006) *arsRBOCT* arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. strain FR-008. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3738-3742.
- Weinel, C., Nelson, K.E., y Tumbler, B. (2002) Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ Microbiol* **4**: 809-818.
- West, S.E., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., y Runyen-Janecky, L.J. (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**: 81-86.
- Wilbur, W.J., y Lipman, D.J. (1983) Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 726-730.
- Willsky, G.R., y Malamy, M.H. (1980) Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**: 366-374.
- Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E., y Brinkman, F.S. (2009) *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: D483-488.
- Wirth, R., Friesenegger, A., y Fiedler, S. (1989) Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* **216**: 175-177.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E., y Puhler, A. (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from

- Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **70**: 25-37.
- Wu, J., y Rosen, B.P. (1993) Metalloregulated expression of the *ars* operon. *J Biol Chem* **268**: 52-58.
- Xu, C., Zhou, T., Kuroda, M., y Rosen, B.P. (1998) Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. *J Biochem* **123**: 16-23.
- Xu, Y., Glansdorff, N., y Labedan, B. (2006) Bioinformatic analysis of an unusual gene-enzyme relationship in the arginine biosynthetic pathway among marine gamma proteobacteria: implications concerning the formation of *N*-acetylated intermediates in prokaryotes. *BMC Genomics* **7**: 4.
- Yamauchi, H., Kaise, T., Takahashi, K., y Yamamura, Y. (1990) Toxicity and metabolism of trimethylarsine in mice and hamsters. *Fundam Appl Toxicol* **14**: 399-407.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Ye, J., Yang, H.C., Rosen, B.P., y Bhattacharjee, H. (2007) Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett* **581**: 3996-4000.

## **VIII. ANEXO I**



## 1. Toxicidad de las diferentes especies de arsénico

Como se puede deducir de la **Tabla 11**, las especies inorgánicas de arsénico representan una mayor amenaza para las células que las orgánicas. Se muestran diferentes respuestas celulares ante los distintos compuestos tóxicos del arsénico.

**Tabla 11. Toxicidad de las especies de arsénico.**

	Especie de arsénico	Dosis Letal Media LD <sub>50</sub> (g kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Respuesta genotóxica (μg/ml) <sup>b</sup>	Genotoxicidad <i>in vitro</i> (mM) <sup>c</sup>	Estructura química
IN ORGÁ NICO	Arsina	0,003 <sup>d</sup>			AsH <sub>3</sub>
	Arsenito [(As(III))]	0,014 <sup>d</sup> ; 0,034 <sup>e</sup>	1-2	>300 mM	AsO <sub>2</sub> H
	Arsenato [(As(V))]	0,02 <sup>d</sup> ; 0,041 <sup>e</sup>	10-14	>1000 mM	AsO <sub>4</sub> H <sub>3</sub>
	Metilarsina (MMA)			30 mM	CH <sub>3</sub> AsH <sub>2</sub>
	Dimetilarsina (DMA)			150 μM	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsH
	Trimetilarsina (TMA)	7,87 <sup>e</sup>			(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As
OR GÁ NICO	Ácido metilarsonico (MMAA)	0,7-1,8 <sup>d</sup> ; 1,8 <sup>e</sup>	2500-5000	>3000 mM	CH <sub>3</sub> AsO(OH) <sub>2</sub>
	Ácido dimetilarsínico (DMAA)	0,7-2,6 <sup>d</sup> ; 1,2 <sup>e</sup>	10000	>300 mM	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO(OH)
	Óxido de trimetilarsina (TMAO)	>10 <sup>g</sup>			(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> AsO
	Ión tetrametilarsonio (TMA <sup>+</sup> )	0,89 <sup>e</sup>			(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> As <sup>+</sup>
	Arsenocolina	>10 <sup>g</sup>			(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	Arsenobetaina	>10 <sup>e</sup>			(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COOH

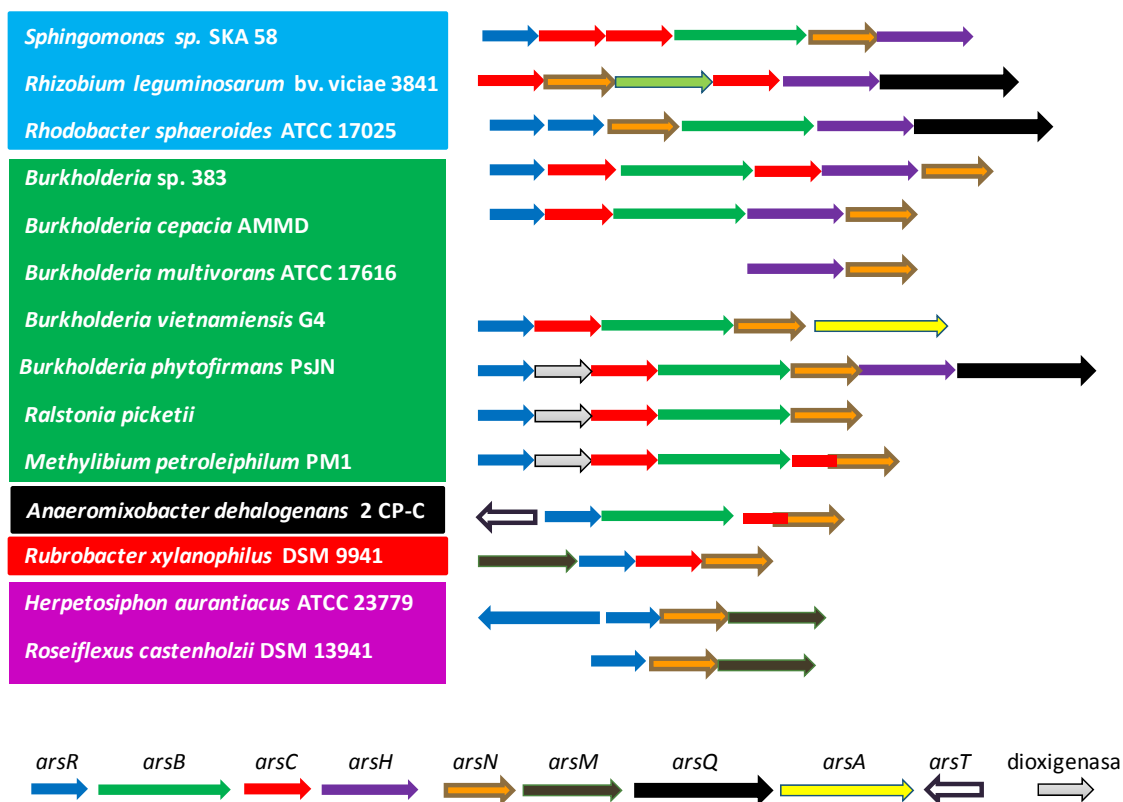
<sup>a</sup> Dosis letal 50; <sup>b</sup> (Moore *et al.*, 1997); <sup>c</sup> (Mass *et al.*, 2001); <sup>d</sup> (Tamaki y Frankenberger, 1992);

<sup>e</sup> (Eguchi *et al.*, 1997); <sup>f</sup> (Kaise *et al.*, 1985); <sup>g</sup> (Yamauchi *et al.*, 1990).

## 2. Genes novedosos descritos como integrantes del operón *ars*

Los análisis filogenéticos y de secuencia de genes homólogos a *arsN*, *arsT* y *arsO* encontrados *in silico* por BLAST, demuestran la distribución de éstos en muchos otros genomas bacterianos. En la **Fig. 49** se muestran un ejemplo de microorganismos pertenecientes a distintos grupos como: Proteobacterias (α-Proteobacterias, β-

Proteobacterias y  $\delta$ -Proteobacterias), Actinobacterias y *Cloroflexi* que contienen alguno de los mismos.



**Fig. 49. Organización genética de operones *ars* que contienen genes novedosos.** Los organismos están encuadrados según filogenia. En cuadro azul  $\alpha$ -Proteobacterias, en verde  $\beta$ -Proteobacterias, en negro  $\delta$ -Proteobacterias, en rojo Actinobacterias y en morado *Cloroflexi*.

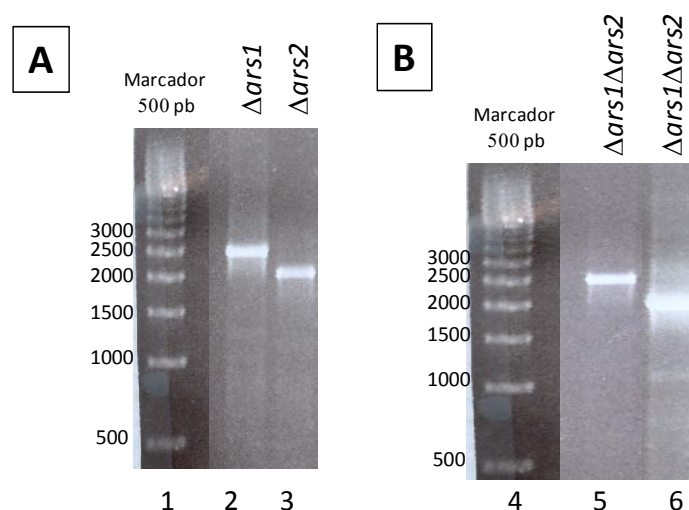
### 3. Construcción de cepas mutantes

Los distintos mutantes de *P. putida* KT2440 donde se delecionaron los operones *ars1* y *ars2* así como los genes *arsH1*, *arsH2*, *arsR1*, *arsR2*, *phoN1* y *phoN2*, se elaboraron siguiendo el procedimiento descrito en el punto 6.5.2 del apartado Materiales y Métodos. Para el caso de las cepas mutantes dobles  $\Delta ars1\Delta ars2$ ,  $\Delta H1\Delta H2$ ,  $\Delta R1\Delta R2$  y  $\Delta phoN1\Delta phoN2$  se adoptó el procedimiento detallado en el punto 6.5.3 del mismo apartado.

#### 3.1. Mutantes $\Delta ars1$ , $\Delta ars2$ y $\Delta ars1\Delta ars2$

Para poder estudiar el papel de cada uno de los operones *ars* de *P. putida* KT2440, constituidos por *arsRBCH* en cada caso, se delecionaron del cromosoma los 4 genes de

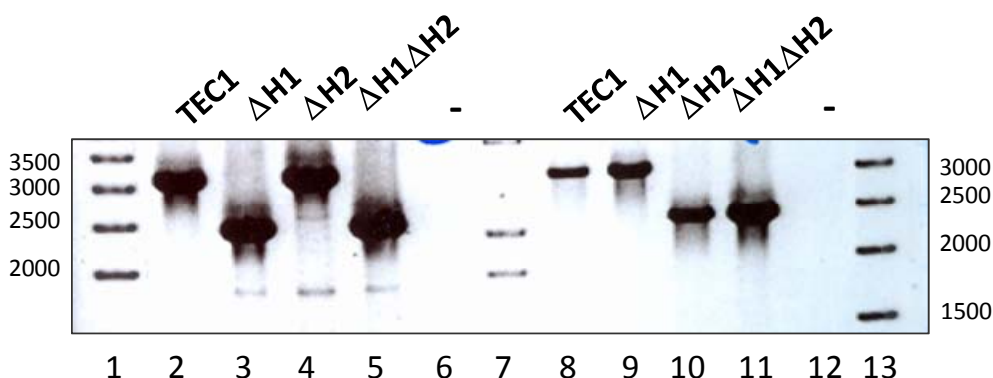
interés así como sus putativas regiones promotoras. En la **Fig. 50** se puede observar el tamaño de las bandas amplificadas por PCR, en cada uno de los casos, para comprobar la correcta delección. Para el caso del mutante  $\Delta ars1$  se utilizaron la pareja de oligos oFWDars1Up y oRVSArs1Down, que generaba un tamaño de banda de 2.49 kb en el caso de la correcta eliminación del operón *ars1*. Para verificar la delección  $\Delta ars2$ , se buscó un amplificado de 2.1 kb cuando se utilizaron los oligos oFWDars2Up y oRVSArs2Down en la reacción de PCR.



**Fig. 50. Confirmación por PCR de la obtención de mutantes de delección de los operones *ars1* y *ars2*.** En los carriles 2 y 5 se utilizó el par de oligos de amplificación de la región *ars1*UD (regiones *Up* y *Down* del operón *ars1*) oFWDars1Up/oRVSArs1Down. En los carriles 3 y 6, el par de oligos utilizado fue oFWDars2Up/oRVSArs2Down, que amplifican a *ars2*. Los carriles 1 y 4 son el marcador de 500 pares de bases. **(A)** mutantes simples  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$ . **(B)** doble mutante  $\Delta ars1\Delta ars2$ . Los tamaños encontrados son los adecuados en todos los casos.

### 3.2. Mutantes $\Delta H1$ , $\Delta H2$ y $\Delta H1\Delta H2$

Con el fin de poder caracterizar si los genes *arsH* de *P. putida* KT2440 estaban involucrados en procesos de resistencia a arsénico se procedió a deleccionar de manera precisa dichos genes. Se pudo, por tanto, observar la diferencia de tamaño entre las bandas amplificadas por PCR de los mutantes  $\Delta H1$ ,  $\Delta H2$  y  $\Delta H1\Delta H2$  con respecto a la cepa silvestre utilizando los oligos adecuados para amplificar los operones completos oFWDars1/oRVSArs1 y oFWDars2/oRVSArs2 (**Fig. 51**).



**Fig. 51. Confirmación por PCR de la obtención de mutantes de delección en los genes *arsH1* y *arsH2*.** En los carriles 2, 3, 4 y 5 se utilizó el par de oligos de amplificación del operón *ars1* (oFWDars1/oRVSArs1). En los carriles 8, 9, 10 y 11, el par de oligos utilizado fue oFWDars2/oRVSArs2, que amplifican el operón *ars2*. Se observa cómo en las cepas mutantes correspondientes existe una diferencia de tamaño (726 para  $\Delta H1$  y 702 para  $\Delta H2$ ). Los carriles 1 y 13 son el marcador de 500 pares de bases y el 7 el  $\lambda Bst$ II. Los carriles 6 y 12 representan los controles negativos de cada reacción de PCR.

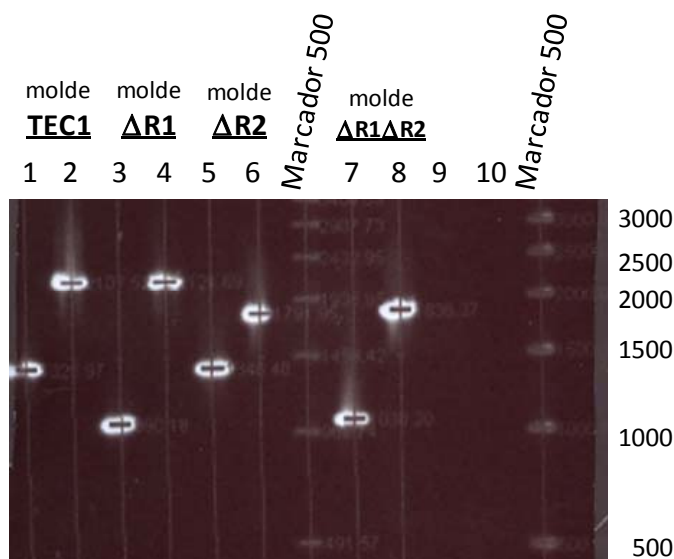
### 3.3. Mutantes $\Delta R1$ , $\Delta R2$ y $\Delta R1\Delta R2$

En dichas cepas mutantes se deleciona desde el primer ATG de *arsR* hasta el codón de terminación del mismo gen, respetando el correspondiente promotor putativo *Pars*. Para la identificación de las cepas delecionadas se realizó una reacción de PCR de colonias y se observó la diferencia de tamaño entre los amplificados de los mutantes  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$  y  $\Delta R1\Delta R2$  con respecto a la cepa silvestre, utilizando los oligos adecuados, oRVSArs1/oFWDB1 para  $\Delta R1$  y oRVSB2/oRVSArs2Down para  $\Delta R2$  (**Fig. 52**).

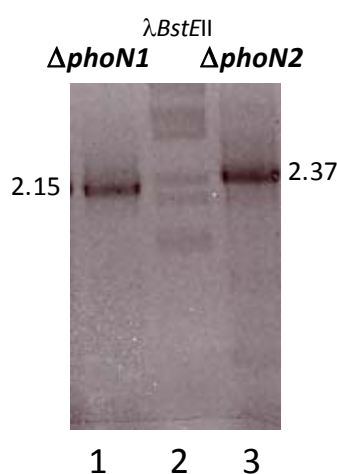
### 3.4. Mutantes $\Delta phoN1$ , $\Delta phoN2$ y $\Delta phoN1\Delta phoN2$

Para la determinación del papel que ejerce cada uno de los genes anotados como PPT-*N*-acetiltransferasas en el genoma de *P. putida* KT2440 (genes *phoN1* y *phoN2*), se eliminaron los mismos de manera precisa del cromosoma. En la identificación de las delecciones correctas se utilizaron reacciones de PCR de colonias con los pares de oligos oFWDPPT1Up/oRVSPPT1Down y oFWDPPT2Up/oRVSPPT2Down para  $\Delta phoN1$  y  $\Delta phoN2$ , respectivamente. Ambos pares de oligos flanquean los sitios de interés y amplifican las regiones correspondientes, con o sin el gen que se elimina. De este modo, los fragmentos buscados con las condiciones descritas previamente son de un tamaño de 2.15 y 2.37 kb para  $\Delta phoN1$  y  $\Delta phoN2$ , en cada caso (**Fig. 53**).





**Fig. 52. Análisis por PCR de  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$  y  $\Delta R1\Delta R2$ .** Diferencia de tamaño entre las bandas amplificadas de los mutantes con respecto a la cepa silvestre TEC1. Se utilizaron los oligos oRVSArs1 y oFWDB1 (oligosR1) para verificar la delección en *arsR1* (carriles 1,3,5,7,9). En el caso de *arsR2* los oligos empleados fueron oRVSArs2Down y oRVSB2 (oligos R2) en los carriles 2,4,6,8,10. Los carriles 9 y 10 representan el control negativo de la reacción.



**Fig. 53. Confirmación por PCR de la obtención de mutantes de delección de los genes *phoN1* y *phoN2*.**

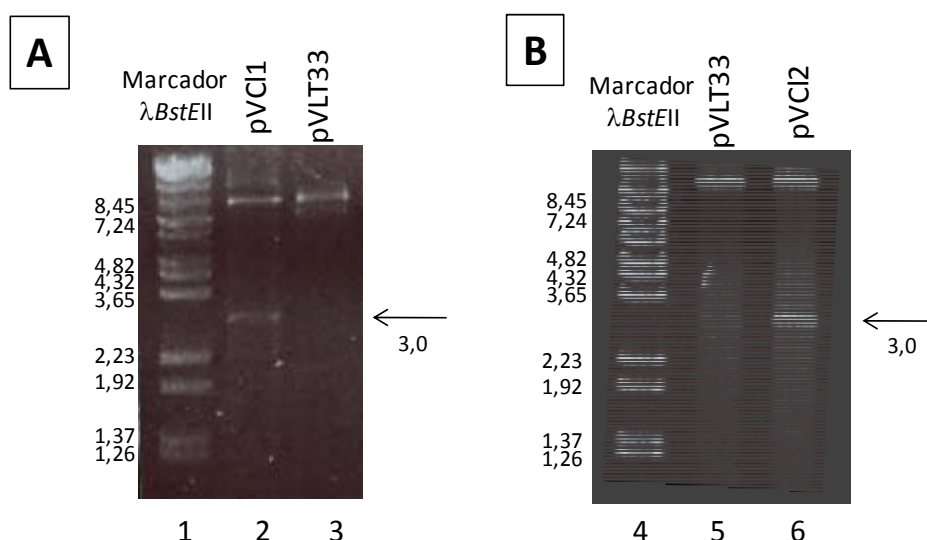
En los carriles 1, y 3 se utilizaron el par de oligos oFWDPPT1Up / oRVSPPT1Down y oFWDPPT2Up / oRVSPPT2Down que amplifican las regiones PPT1UD y PPT2UD, respectivamente. El carril 2 corresponde al marcador  $\lambda BstEII$ . La cepa doble mutante presenta los mismos resultados que cada uno de los mutantes individuales mostrado (datos no presentados). Los tamaños encontrados son los adecuados en todos los casos.

#### 4. Construcción de los plásmidos utilizados para complementaciones

Los plásmidos pVCI1, pVCI2, pVH1, pVH2, pVR1, pVR2, pVPPT1 y pVPPT2 se elaboraron siguiendo las pautas descritas en el punto 6.5.4 del apartado Materiales y Métodos. En el caso de pUCPArsN, el procedimiento se detalla en 6.5.4 del mismo apartado. Se verificó la secuencia correcta de todas las construcciones a través del Servicio de Secuenciación.

#### 4.1. Plásmidos pVCI1 y pVCI2

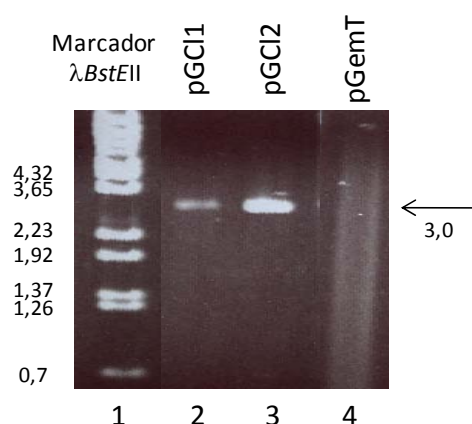
Los plásmidos pVCI1 y pVCI2, conteniendo los operones *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 respectivamente, fueron elaborados poder complementar los mutantes  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$ . En la **Fig. 54** podemos observar la banda de 3 kb aprox. perteneciente a cada operón *ars* después de digerir cada uno de los vectores construidos con los enzimas *EcoRI* y *HindIII*. También se observa cómo en el control del plásmido vacío (pVLT33) no presenta ninguna banda.



**Fig. 54. Comprobación de la clonación de los operones *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 en pVCI1 y pVCI2, respectivamente.** Se utilizó el vector vacío como control negativo (carriles 3 y 5). Para la doble digestión se usó *EcoRI* y *HindIII* como enzimas de restricción. **(A)** Banda de 3.13 kb perteneciente a *ars1*. **(B)** Banda de 3.09 kb perteneciente al operón *ars2*. Los carriles 1 y 4 muestran el marcador  $\lambda$ BstEII.

#### 4.2. Plásmidos pGCI1 y pGCI2

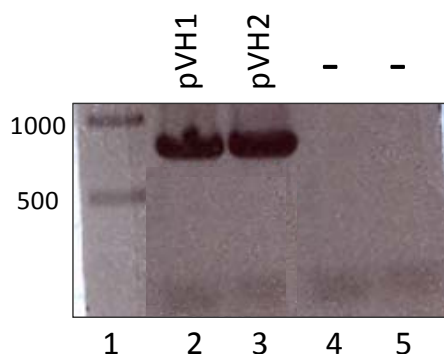
Para expresar en *E. coli* los operones *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 (con sus regiones promotoras), se utilizaron los plásmidos pGEMT-Easy como vectores de clonación, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se obtuvieron así pGCI1 y pGCI2, respectivamente. Para verificar la correcta clonación se amplificaron por PCR de colonia ambos vectores con los oligos adecuados en cada caso: oFWDars1/oRVSArs1 y oFWDars2/oRVSArs2 (**Fig. 55**).



**Fig. 55. Comprobación de la clonación de los operones *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440 en pGCl1 y pGCl2, respectivamente.** Se utilizó el vector vacío pGemT-Easy como control negativo (carril 4). Para la PCR de comprobación de las clonaciones se usaron las parejas de oligos oFWDars1 / oRVSArs1 (carril 2) y oFWDars2 / oRVSArs2 (carril 3), respectivamente. En el carril 1 se muestra el marcador  $\lambda$ BstEII.

### 4.3. Plásmidos pVH1 y pVH2

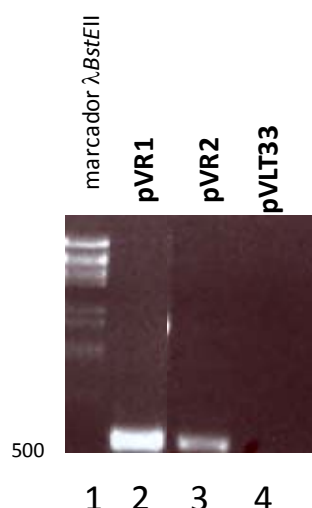
Con el fin de poder complementar a las mutaciones en los genes *arsH* de *P. putida* KT2440 y poder expresarlos además de manera heteróloga, se elaboraron los plásmidos pVH1 y pVH2. Los genes amplificados además incorporan sus propias RBSs. En la **Fig. 56** se puede apreciar la banda correspondiente al amplificado *arsH1* y *arsH2* a partir de pVH1 y pVH2, de 726 y 711 pb, respectivamente. Se utilizaron los oligos oFWDH1/oRVSH1 y oFWDH2/oRVSH2 en cada caso.



**Fig. 56. Amplificación de los genes *arsH1* y *arsH2* de *P. putida* KT2440 clonados en pVH1 y pVH2, respectivamente.** Se utilizó el vector vacío (pVLT33) como control negativo de la reacción (carriles 4 y 5). Para amplificar *arsH1* se usó la pareja de oligos oFWDH1 y oRVSH1 (2). En el caso de *arsH2* (carril 3) el par utilizado fue oFWDH2 y oRVSH2. En el carril 1 se muestra el marcador de 500 pb.

### 4.4. Plásmidos pVR1 y pVR2

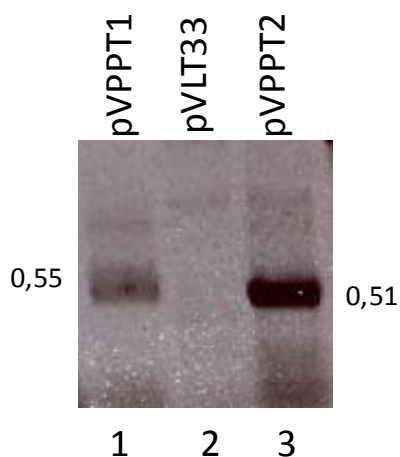
Para complementar a las mutaciones en los genes reguladores de *P. putida* KT2440, se construyeron los plásmidos pVR1 y pVR2. Los genes amplificados por PCR de colonia además incorporan los putativos promotores *Pars1* y *Pars2*, respectivamente, así como sus propias RBS. En la **Fig. 57** se puede ver la banda correspondiente al amplificado de *arsR1* (504 pb) y *arsR2* (531 pb) a partir de pVR1 y pVR2, en cada caso, utilizando el vector vacío (pVLT33) como control negativo de la reacción.



**Fig. 57. Amplificación de los genes reguladores *arsR1* y *arsR2* de *P. putida* KT2440 clonados en pVR1 y pVR2, respectivamente.** Se utilizó el vector vacío como control negativo de la reacción (carril 4). Para amplificar *arsR1* (carril 2) se usó la pareja de oligos oFWDR1 y oRVSr1. En el caso de *arsR2*, (carril 3) fue oFWDR2 y RVSr2 el par utilizado. En el carril 1 se muestra el marcador  $\lambda$ BstEII.

#### 4.5. Plásmidos pVPPT1 y pVPPT2

Estas construcciones se elaboraron los a través de la clonación de los genes *phoN1* y *phoN2* de *P. putida* KT2440 (incluyendo sus propias RBSs) en el vector pVLT33. Se pudieron así complementar las mutaciones en estos genes, así como sobreexpresarlos en cepas de *E. coli*. Una vez construidos, se comprobaron a través de la amplificación por PCR de colonia utilizando los oligos oFWDPPT1/oRVSPPT1 (obteniendo una banda de 0.55 kb) y oFWDPPT2/oRVSPPT2 (de 0.51 kb; **Fig. 58**).



**Fig. 58. Amplificación de los genes *phoN1* y *phoN2* de *P. putida* KT2440 clonados en pVPPT1 y pVPPT2, respectivamente.** Se utilizó el vector vacío como control negativo de la reacción (carril 2). Para amplificar *phoN1* (carril 1) se usó la pareja de oligos oFWDPPT1 y oRVSPPT1. En el caso de *phoN2*, (carril 3) fue oFWDPPT2 y RVSPPT2 el par utilizado.

#### 4.6. Plásmido pUCP-ArsN

Esta construcción tiene el gen *arsN* de *P. putida* KT2440 expresado bajo el promotor *Plac* y con su propio RBS en el vector pUCP24. Para comprobar la correcta clonación

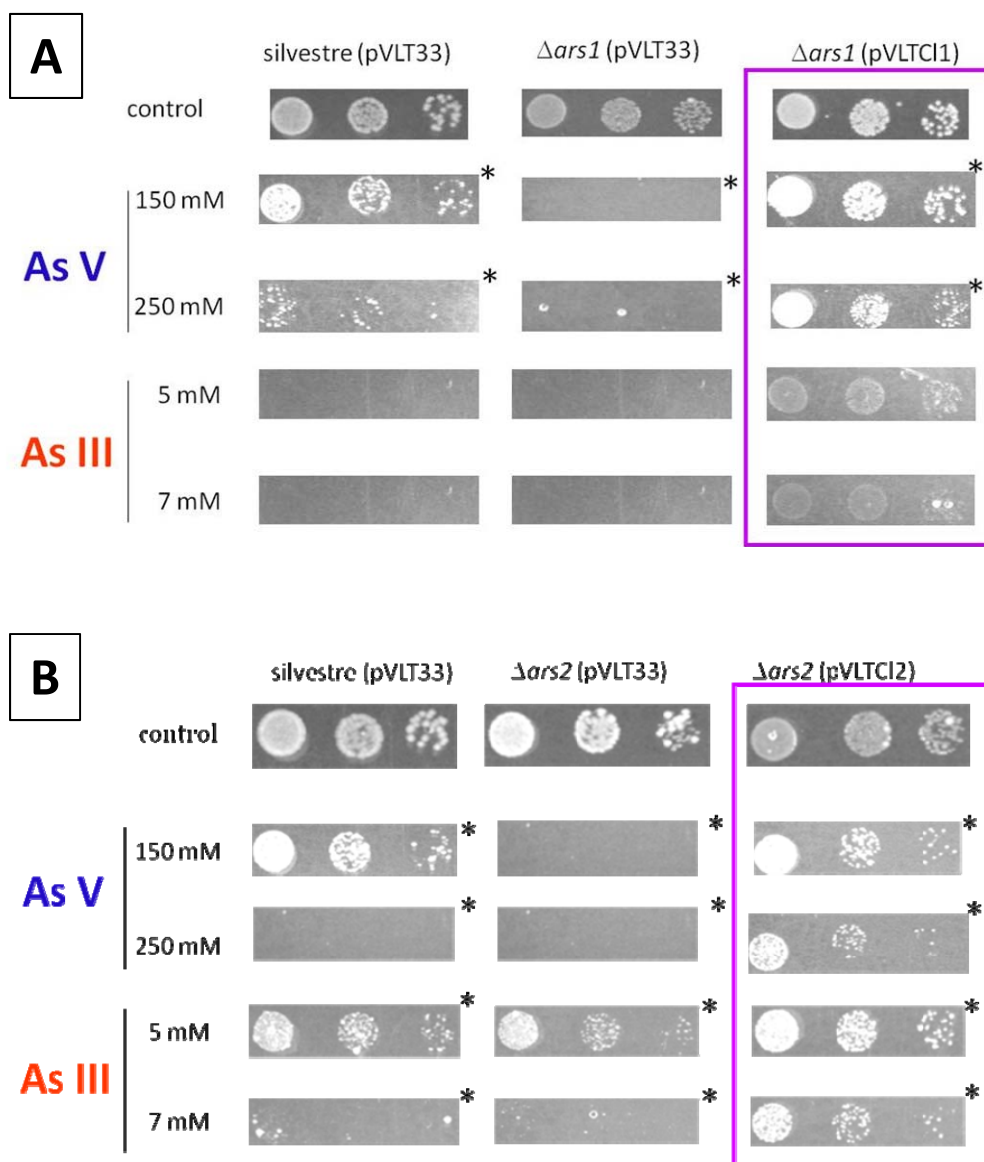
del gen se utilizaron los oligos oFWD*ArsN* y oRVSA*ArsN* que amplificaban un fragmento de 530 pb. Se utilizó el vector vacío como control negativo de la reacción de PCR (**Fig. 59**).



**Fig. 59. Amplificación de *arsN* a partir del vector pUCP-ArsN.** El carril 1 muestra la banda con el tamaño correcto. En el carril 2 se usó como control negativo de la reacción de PCR el vector vacío. Se muestra el marcador de 500 pb como referencia.

##### **5. Recuperación de los fenotipos silvestres complementando mutantes $\Delta ars1$ y $\Delta ars2$ con pVCI1 y pVCI2**

Una vez realizadas las delecciones de los operones *ars* de *P. putida* KT2440 y estudiado su fenotipo, se complementaron con los correspondientes plásmidos para ver la recuperación funcional de los mecanismos eliminados. De este modo, se transformaron las cepas  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$  con los vectores pVCI1 y pVCI2, respectivamente. Se pudo observar, como indica la **Fig. 60**, que las cepas ahora complementadas presentan resistencia frente a las formas de arsénico estudiadas incluso mayores a las del microorganismo silvestre (muy posiblemente como consecuencia de la presencia de un mayor número de copias de los operones). Para la sobreexpresión se indujeron los sistemas utilizando 1 mM de IPTG, creciendo a las células en medios con presencia de Km. Se utilizó el plásmido vacío pVLT33 como control negativo.



**Fig. 60. Ensayo en placa de resistencia a As(V) y As(III) de los mutantes *ars* complementados.** Se puede comprobar la tolerancia frente a As(V) y As(III) de las cepas de *P. putida* KT2440, **(A)** TEC1 (pVLT33)  $\Delta ars1$  (pVLT33) y  $\Delta ars1$  (pVLTCl1) y **(B)** TEC1 (pVLT33)  $\Delta ars2$  (pVLT33) y  $\Delta ars2$  (pVLTCl2) a las concentraciones indicadas. Las gotas mostradas tenían un volumen de 8  $\mu$ l y representan distintas diluciones seriadas (de izquierda a derecha:  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  células/ml). Los controles se realizaron sobre placas de LB agar Ura Km IPTG. En morado se resalta la recuperación del fenotipo de *P. putida* KT2440. Fotos tomadas tras 16 h de incubación, salvo las indicadas con asteriscos que

## 6. Genes contenidos en la isla de 62 kb donde se encuentra *ars1*

La composición de la región atípica del genoma de *P. putida* KT2440 donde se encuentra localizado el operón *ars1* se encuentra detallada en la **Tabla 12**.

Tabla 12.

LOCUS	Gen	Función
PP_1919	<b><i>tmK</i></b>	Timidilato kinasa, porción C-terminal
PP_1920		Proteína hipotética
PP_1921		Proteína hipotética
PP_1922		Proteína hipotética
PP_1923		Proteína hipotética
PP_1924	<b><i>phoN1</i></b>	PPT- <i>N</i> -acetiltransferasa, putativa
PP_1925		Monooxigenasa, putativa
PP_1926		Proteína de la familia de las fosfatasas, putativa
PP_1927		Proteína de resistencia a arsénico ArsH, putativa
PP_1928	<b><i>arsC1</i></b>	Arsenato reductasa
PP_1929	<b><i>arsB1</i></b>	Transportador de expulsión de arsenito
PP_1930	<b><i>arsR1</i></b>	Regulador transcripcional de resistencia a arsénico
PP_1931		Proteína hipotética conservada
PP_1932		Proteína hipotética
PP_1933		Proteína hipotética
PP_1934		Proteína hipotética
PP_1935		Regulador transcripcional de la familia Cro/Ci
PP_1936		Proteína hipotética
PP_1937		Helicasa, putativa
PP_1938		Proteína hipotética
PP_1939		Deshidrogenasa formaldehído, truncada
PP_1940		Transductor aceptor de metilo de quimiotaxis
PP_1941		Proteína hipotética
PP_1942		Regulador transcripcional, familia LysR
PP_1943	<b><i>purU-3</i></b>	Deformilasa formiltetrahidrofolato
PP_1944		Aminometiltransferasa, putativa
PP_1945	<b><i>folD-1</i></b>	Deshidrogenasa/ciclohidrolasa 5,10-metilen-tetrahidrofolato
PP_1946		Oxidoreductasa, deshidrogenasa de cadena corta/familia reductasa
PP_1947		Proteína hipotética conservada
PP_1948		Deshidrogenasa benzaldehído
PP_1949		Oxidoreductasa, familia GMC
PP_1950		Proteína hipotética conservada
PP_1951		Oxidoreductasa, deshidrogenasa de cadena corta/familia reductasa
PP_1952		Proteína de la familia metalo- $\beta$ -lactamasa
PP_1953		Oxidoreductasa, deshidrogenasa de cadena corta/familia reductasa
PP_1954		Proteína hipotética conservada
PP_1955		Proteína de la familia citocromo P450
PP_1956		Proteína hipotética
PP_1957		Oxidoreductasa
PP_1958		Proteína hipotética

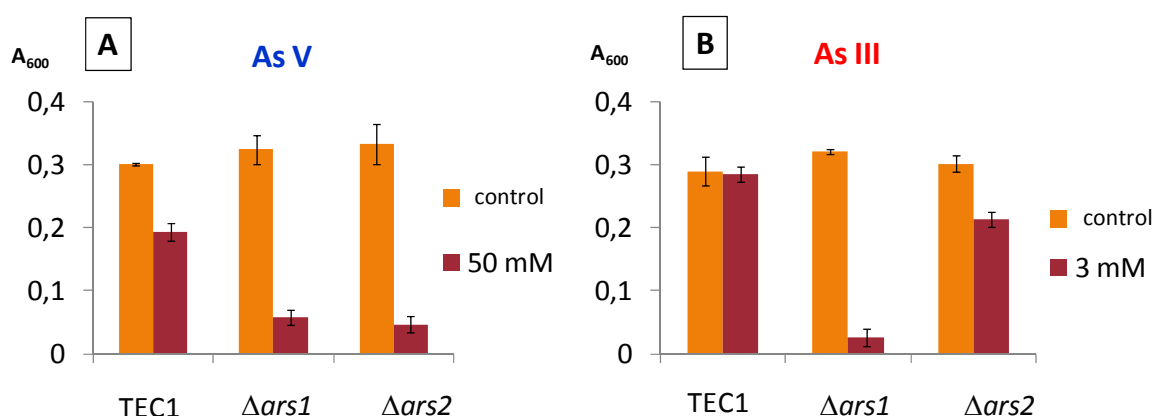
PP_1959		Proteína hipotética
PP_1960		Proteína hipotética
PP_1961		Proteína hipotética
PP_1962		Recombinasa específica de sitio, familia de integrasas de fagos
PP_1963		Proteína hipotética
PP_1964		Kinasa desoxinucleótido monofosfato, putativa
PP_1965	<i>tmk</i>	Timidilato kinasa, porción N-terminal

## 7. El estrés osmótico no es el factor que determina la ecoparalogía entre *ars1* y *ars2*

Para determinar la posible *ecoparalogía* entre los sistemas *ars1* y *ars2* de *P. putida* KT2440, se estudió el estrés salino como posible condición ambiental desencadenante de una variación en la funcionalidad. De este modo, se utilizaron altas concentraciones de sal (hasta 500 mM de NaCl) como agente osmótico. No se observó ningún efecto de esta molécula sobre el comportamiento de las cepas de estudio respecto al control sin sal (**Fig. 61**). Se representa la resistencia a las distintas concentraciones indicadas de As(V) y As(III), tras 8 h de incubación a 30°C y con 400 mM de NaCl, y se observa que el fenotipo no varía respecto a las condiciones sin sal (comparar con Fig. 16 b y d), siendo la resistencia a los tóxicos en cualquier caso:

As(V): **cepa silvestre >  $\Delta ars1$  ~  $\Delta ars2$**

As(III): **cepa silvestre >  $\Delta ars2$  >  $\Delta ars1$**



**Fig. 61. Resistencia a arsénico de TEC1,  $\Delta ars1$  y  $\Delta ars2$  en condiciones de estrés osmótico. (A)** Muestra la resistencia, medida como A<sub>600</sub> nm, de las diferentes cepas frente a As(V) mientras que **(B)** lo hacen frente a As(III). El medio de cultivo estaba constituido por LB U NaCl (0,4 M). Los controles muestran crecimiento en condiciones sin arsénico. Resultados obtenidos tras 8 h de incubación a 30°C. Ensayos realizados con triplicados biológicos.



## 8. Uso de codones de *phoN1* vs *phoN2*

Al encontrarse en localizaciones muy distintas del genoma, se advirtieron diferencias significativas en el contenido de GC y la distribución del uso de codones de los genes *phoN1* respecto de *phoN2* (**Fig. 62**), siendo uno de los indicativos de la divergencia entre ambos genes.

		2nd					
1st	T	C	A	G	3rd		
T	TTT Phe (F) 1.06% 2	TCT Ser (S) 0% 0	TAT Tyr (Y) 3.74% 7	TGT Cys (C) 0% 0	T		
	TTC Phe (F) 2.67% 5	TCC Ser (S) 1.06% 2	TAC Tyr (Y) 2.13% 4	TGC Cys (C) 0% 0	C		
	TTA Leu (L) 0.53% 1	TCA Ser (S) 0.53% 1	TAA STOP 0% 0	TGA STOP 0% 0	A		
	TTG Leu (L) 0.53% 1	TCG Ser (S) 0.53% 1	TAG STOP 0.53% 1	TGG Trp (W) 1.60% 3	G		
C	CTT Leu (L) 0.53% 1	CCT Pro (P) 0.53% 1	CAT His (H) 1.06% 2	CGT Arg (R) 2.67% 5	T		
	CTC Leu (L) 2.13% 4	CCC Pro (P) 1.06% 2	CAC His (H) 2.13% 4	CGC Arg (R) 2.67% 5	C		
	CTA Leu (L) 0.53% 1	CCA Pro (P) 1.60% 3	CAA Gln (Q) 2.67% 5	CGA Arg (R) 1.60% 3	A		
	CTG Leu (L) 3.74% 7	CCG Pro (P) 2.67% 5	CAG Gln (Q) 2.13% 4	CGG Arg (R) 1.60% 3	G		
A	ATT Ile (I) 1.60% 3	ACT Thr (T) 0% 0	AAT Asn (N) 0.53% 1	AGT Ser (S) 1.60% 3	T		
	ATC Ile (I) 4.81% 9	ACC Thr (T) 1.06% 2	AAC Asn (N) 0.53% 1	AGC Ser (S) 1.06% 2	C		
	ATA Ile (I) 0% 0	ACA Thr (T) 0% 0	AAA Lys (K) 0% 0	AGA Arg (R) 0.53% 1	A		
	ATG Met (M) 1.06% 2	ACG Thr (T) 2.13% 4	AAG Lys (K) 1.06% 2	AGG Arg (R) 0% 0	G		
G	GTT Val (V) 0.53% 1	GCT Ala (A) 3.20% 6	GAT Asp (D) 3.20% 6	GGT Gly (G) 1.06% 2	T		
	GTC Val (V) 2.67% 5	GCC Ala (A) 2.67% 5	GAC Asp (D) 1.06% 2	GGC Gly (G) 3.20% 6	C		
	GTA Val (V) 0.53% 1	GCA Ala (A) 1.06% 2	GAA Glu (E) 3.20% 6	GGA Gly (G) 2.13% 4	A		
	GTG Val (V) 5.88% 11	GCG Ala (A) 3.20% 6	GAG Glu (E) 3.74% 7	GGG Gly (G) 2.13% 4	G		

		2nd					
1st	T	C	A	G	3rd		
T	TTT Phe (F) 2.32% 4	TCT Ser (S) 0% 0	TAT Tyr (Y) 0.58% 1	TGT Cys (C) 0.58% 1	T		
	TTC Phe (F) 1.74% 3	TCC Ser (S) 0% 0	TAC Tyr (Y) 2.32% 4	TGC Cys (C) 0% 0	C		
	TTA Leu (L) 0% 0	TCA Ser (S) 0% 0	TAA STOP 0% 0	TGA STOP 0.58% 1	A		
	TTG Leu (L) 0.58% 1	TCG Ser (S) 1.74% 3	TAG STOP 0% 0	TGG Trp (W) 2.32% 4	G		
C	CTT Leu (L) 0.58% 1	CCT Pro (P) 0.58% 1	CAT His (H) 1.16% 2	CGT Arg (R) 1.74% 3	T		
	CTC Leu (L) 2.32% 4	CCC Pro (P) 0% 0	CAC His (H) 1.16% 2	CGC Arg (R) 4.65% 8	C		
	CTA Leu (L) 0% 0	CCA Pro (P) 0.58% 1	CAA Gln (Q) 0.58% 1	CGA Arg (R) 0.58% 1	A		
	CTG Leu (L) 5.81% 10	CCG Pro (P) 3.48% 6	CAG Gln (Q) 3.48% 6	CGG Arg (R) 0.58% 1	G		
A	ATT Ile (I) 1.16% 2	ACT Thr (T) 0% 0	AAT Asn (N) 0.58% 1	AGT Ser (S) 0% 0	T		
	ATC Ile (I) 1.74% 3	ACC Thr (T) 4.65% 8	AAC Asn (N) 2.90% 5	AGC Ser (S) 1.16% 2	C		
	ATA Ile (I) 0.58% 1	ACA Thr (T) 0% 0	AAA Lys (K) 0.58% 1	AGA Arg (R) 0% 0	A		
	ATG Met (M) 2.90% 5	ACG Thr (T) 0.58% 1	AAG Lys (K) 1.16% 2	AGG Arg (R) 0% 0	G		
G	GTT Val (V) 1.16% 2	GCT Ala (A) 0.58% 1	GAT Asp (D) 1.74% 3	GGT Gly (G) 0% 0	T		
	GTC Val (V) 1.16% 2	GCC Ala (A) 2.32% 4	GAC Asp (D) 4.06% 7	GGC Gly (G) 6.97% 12	C		
	GTA Val (V) 0% 0	GCA Ala (A) 1.16% 2	GAA Glu (E) 3.48% 6	GGA Gly (G) 0.58% 1	A		
	GTG Val (V) 8.72% 15	GCG Ala (A) 5.23% 9	GAG Glu (E) 2.32% 4	GGG Gly (G) 2.32% 4	G		

**Fig. 62. Uso de codones relativo de los genes *phoN* de *P. putida* KT2440.** Se muestra (A) la distribución en *phoN1* (PP\_1924) y en (B) *phoN2*. Se utilizó la aplicación *Codon Usage Display* del software TIGR (© J. Craig Venter Institute, <http://cmr.jcvi.org/>).

